



**UNIVERSITE DE LIEGE  
FACULTE DE MEDECINE VETERINAIRE  
DEPARTEMENT DES SCIENCES FONCTIONNELLES  
SERVICE DE BIOCHIMIE**

**Analyse de l'ossification endochondrale dans le cadre de souris déficientes  
en 5-phosphatase SHIP2, un modèle potentiel pour l'opsismodysplasie  
humaine ?**

**Analysis of endochondral ossification process in SHIP2 deficient mice, a  
potential model for human opsismodysplasia ?**

**Charles-Andrew VANDE CATSYNE**

**THESE PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE  
Docteur en Sciences Vétérinaires**

**ANNEE ACADEMIQUE 2019-2020**



## **Remerciements**

Ici, je tiens à exprimer ma sincère gratitude à toutes les personnes qui, de près ou de loin, m'ont précieusement aidé à réaliser cette thèse de doctorat.

*Pour cela, je ne peux que commencer en remerciant chaleureusement mon promoteur de thèse, le professeur Stéphane Schurmans. En effet, je le remercie de m'avoir ouvert les portes du monde de la recherche en m'accueillant dans son laboratoire et pour la confiance qu'il m'a accordée. Nos Lab Meetings auront toujours été un moment agréable et où la liberté intellectuelle avait sa place. Stéphane réalise à la perfection sa mission de promoteur, en restant lui-même : une personne disponible, patiente, honnête, gentille, d'humeur positive et toujours à l'écoute. Je trouve que la phrase « Always look on the bright side of life » qualifie parfaitement sa personnalité. Un tout grand MERCI !*

*Je voudrais ensuite remercier les autres personnes qui m'ont aidées à faire mes premiers pas dans le monde du laboratoire et de la recherche. Je remercie Laora et Jonas pour leur sympathie et pour m'avoir permis de m'intégrer si rapidement dans le rouage du laboratoire. Je voudrais ensuite remercier 3 post doctorants : Ariane et particulièrement Sufyan et Patricia. Je les remercie d'avoir toujours été d'une grande disponibilité, d'avoir répondu à mes innombrables questions et pour leur aide dans de nombreuses manip. Leur avis critique et leurs connaissances ont énormément aidés à la réalisation de ce travail. Ce duo indo-espagnol a par ailleurs apporté une ambiance chaleureuse particulièrement agréable que je n'oublierai pas. Les tentatives de français de Sufyan et le grain de folie de Patricia me feront toujours sourire. Grâce à eux je suis devenu incollable sur la compréhension de l'accent anglo-indien et anglo-espagnol. Merci à vous !*

*Evidemment, je ne peux m'empêcher de remercier Bastien ! Nos discussions pseudo-philosophiques (une pierre est-elle vivante ??) resteront toujours un beau souvenir, de même que nos blagues mutuelles quotidiennes ! (NB : évidemment j'ai toujours agi en légitime-défense...). On a quand même bien rigolé. J'ai vraiment apprécié notre interaction, d'avoir pu partager nos pensées, nos résultats préliminaires, nos échecs, nos manip touchées par la loi de Murphy (WB=fail), les appels de Jardon... Je pense que tu apportes vraiment quelque chose de plus dans le laboratoire avec ta rigueur scientifique, et je te souhaite la meilleure des réussites car tu le mérites sincèrement. Quand tu as commencé ton mémoire de fin d'année dans le laboratoire, tu avais déjà l'étoffe d'un doctorant. Aujourd'hui, tu as déjà tout d'un post-doctorant avant l'heure. A vrai dire, il y a tout de même une chose que je regrette... mais vraiment beaucoup... c'est que tu ne sois pas arrivé plus tôt dans le labo ! Un très grand merci à toi !*

*Je remercie Halim pour sa sympathie et ses conseils qui m'ont aidé dans ce doctorat (et pour m'avoir montré que l'on peut faire 20 western blot sur une journée...). Grâce à lui, je vérifie dorénavant systématiquement le stock de réactifs avant de commencer une manip !*

*Je voudrais également remercier mon comité de thèse composé des professeurs Christophe Erneux et Luc Grobet. Nos riches discussions à l'occasion de notre réunion annuelle ont clairement permis d'orienter ce projet au cours des années.*

*Un grand merci à nos voisins de palier : les laboratoires de Fabrice Bureau et Thomas Marichal. En particulier aux doctorants et techniciens pour leurs conseils et pour avoir mis l'ambiance dans ce long couloir et au cours de ces années. Vos blagues et vos folies m'ont bien fait rire et vos rires ont vraiment mis de la vie.*

*Ce doctorat n'aurait évidemment pas pu se réaliser sans tout ce qui tourne autour du laboratoire, comme le GIGA, et en particulier le personnel de la plateforme imagerie, de la plateforme d'immuno-histologie, Fabienne à la réception (merci pour les chics) et à toutes les personnes qui m'ont dépanné d'un réactif en urgence ce qui m'a permis d'éviter l'échec de bien des manips !*

*Enfin je terminerai par remercier le professeur Géraldine Baugnée (et JMCSR) pour ses yeux attentifs de relecture. Et évidemment, je remercie infiniment ma merveilleuse épouse, Sophie, qui m'a fréquemment attendu le soir quand mes manips prenaient du retard, qui m'accompagné tout au long de ce travail jusqu'à venir les weekends au labo, qui m'a épaulé durant les moments de doute, et en qui j'ai une confiance absolue, MERCI !*

*Mon tout dernier mot sera pour... moi ! Félicitations pour avoir osé faire un pas en dehors des sentiers battus en te lançant dans ce doctorat. En plus d'avoir acquis de nouvelles connaissances et développé ton esprit critique, ces années passées t'ont permis de réaliser de riches rencontres. Il est vrai qu'au tout début, tu t'es toujours dit que tu n'avais rien à perdre, et effectivement cette expérience fut un win-win. Un doctorat est loin d'être un long fleuve tranquille, les vagues sont parfois fortes au point qu'il arrive qu'on boive la tasse, mais grâce à l'entourage, tu es arrivé à bon port. Après tant de moments à penser à cet instant, où tu as rêvé d'écrire ces dernières lignes dans la section remerciements du manuscrit de ta thèse, symbolisant qu'une page allait se tourner avec des souvenirs inoubliables plein la tête et un sentiment de réussite, on y est !*



## *Abréviations*

<b>5-phosphatase</b>	Inositol polyphosphate 5-phosphatase
<b>ACAN</b>	Aggrécane
<b>ADAMTS4</b>	A desintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AKT</b>	Protéine kinase B
<b>APS</b>	Adaptator protein with PH and SH2 domain
<b>ARAF</b>	A-RAF proto-oncogene
<b>ARF1</b>	ADP Ribosylation Factor 1
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléique messenger
<b>ARP 2/3</b>	Actin-related protein 2/3
<b>ASARM</b>	Acidic serine- and aspartate-rich motif
<b>ASH</b>	Abnormal spindle like microencephaly associated protein/spindle pole body 2/hydrin
<b>ATF4</b>	Activating transcription factor 4
<b>BMP</b>	Bone morphogenetic protein
<b>BMP2</b>	Bone morphogenetic protein 2
<b>BMP4</b>	Bone morphogenetic protein 4
<b>BMPR1</b>	Bone morphogenetic protein receptor type 1
<b>BMPR2</b>	Bone morphogenetic protein receptor type 2
<b>BRAF</b>	B-RAF proto-oncogene
<b>BSP</b>	Bone sialoprotein
<b>CBL</b>	Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene
<b>CDP-DAG</b>	Cytidine diphosphate diacylglycérol
<b>c-MET</b>	Récepteur tyrosine kinase MET ou récepteur de facteur de croissance des hépatocytes
<b>COL1A1</b>	Collagène de type I alpha 1
<b>COL2A1</b>	Collagène de type II alpha 1
<b>COS-7</b>	Fibroblastes de signe vert
<b>Cre</b>	Recombinase Cre
<b>DAG</b>	Diacylglycérol
<b>DDR1</b>	Discoidin domain receptor 1
<b>DNA-PK</b>	Protéine kinase dépendante de l'ADN
<b>DUSP</b>	Phosphatases à double spécificité
<b>EGF</b>	Epidermal growth factor
<b>EGF</b>	Facteur de croissance épidermique
<b>EGFR</b>	Récepteur à l'EGF
<b>EPHA2</b>	EPH Receptor A2
<b>ERK1/2</b>	Extracellular signal-regulated kinase 1 and 2
<b>FAK</b>	Focal adhesion kinase
<b>FAM101A</b>	Refilin A
<b>FEME</b>	Endocytose rapide médiée par l'endophiline
<b>FGF</b>	Fibroblast growth factors

<b>FGF18</b>	Fibroblast growth factor 18
<b>FGF23</b>	Fibroblast growth factor 23
<b>FGF9</b>	Fibroblast growth factor 9
<b>FGFR1</b>	Fibroblast growth factor receptor 1
<b>FGFR2</b>	Fibroblast growth factor receptor 2
<b>FGFR3</b>	Fibroblast Growth Factor Receptor 3
<b>Flox</b>	Flanked by LoxP sites
<b>FOX1</b>	RNA binding fox-1 homolog 1
<b>FOXO</b>	Forkhead box O
<b>FRS2</b>	Fibroblast growth factor receptor substrate 2
<b>G6Pase</b>	Glucose-6-phosphatase
<b>GAB</b>	Grb2-associated binder
<b>GAG-1</b>	GRB2 associated binding protein 1
<b>GBR2</b>	Growth factor receptor-binding protein 2
<b>GGA</b>	Complexe de protéines adaptatrices de la clathrine
<b>GLA</b>	Résidus $\gamma$ -carboxyglutamique
<b>GLA-OCN</b>	GLA-ostéocalcine, forme inactive
<b>GLI</b>	GLI Family Zinc Finger
<b>GLU-OCN</b>	GLU-ostéocalcine, forme active
<b>GLUT4</b>	Glucose transporter type 4
<b>GMAP-210</b>	Microtubules-Golgi 210
<b>GM-CSF</b>	Facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages
<b>GPCR</b>	Récepteur couplé à des protéines G
<b>GPX4</b>	Glutathione peroxidase 4
<b>GRB10</b>	Growth factor receptor bound protein 10
<b>GSK3</b>	Glycogen synthase kinase 3
<b>HBx</b>	Hepatitis B virus x protein
<b>HCC</b>	Cellules de carcinome hépatocellulaire
<b>HDAC4</b>	Histone déacétylase 4
<b>HeLa</b>	Lignée de cellules métastatiques provenant de cancer du col d'utérus humain
<b>HH</b>	Hedgehog
<b>HIF1A</b>	Hypoxia inducible factor 1 subunit alpha
<b>HRAS</b>	Harvey RAS proto-oncogene
<b>IGF1</b>	Insulin like growth factor 1
<b>IGF1R</b>	Insulin-like growth factor 1 receptor
<b>IHH</b>	Indian hedgehog signaling molecule
<b>INPP4A</b>	Inositol polyphosphate-4-phosphatase type I A
<b>INPP4B</b>	Inositol polyphosphate-4-phosphatase Type II B
<b>INPP4B</b>	Inositol polyphosphate-4-phosphatase type I B
<b>INPP5B</b>	Inositol polyphosphate-5-phosphatase B
<b>INPP5E</b>	Inositol polyphosphate-5-phosphatase E
<b>INPP5J</b>	Inositol polyphosphate-5-phosphatase J
<b>INPP5K</b>	Inositol polyphosphate 5-phosphatase K
<b>INPPL1</b>	Inositol Polyphosphate Phosphatase Like 1
<b>Ins(1)P</b>	Inositol-1-phosphate
<b>Ins(1,3,4,5)P4</b>	Inositol 1,3,4,5-tétrakisphosphate

<b>Ins(1,4,5)P3</b>	Inositol 1,4,5-trisphosphate
<b>IP3</b>	Inositol-1,4,5-trisphosphate
<b>IQGAP2</b>	IQ motif containing GTPase activating protein 2
<b>IRR</b>	Insulin receptor-related receptor
<b>IRS</b>	Insulin receptor substrate
<b>ITAM</b>	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
<b>ITIM</b>	Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
<b>JNK</b>	c-Jun terminal kinase
<b>KO</b>	Knock-out
<b>KRAS</b>	Kirsten RAS proto-oncogene
<b>MAGMAS</b>	Mitochondria-associated granulocyte macrophage colony stimulating factor-signaling molecule
<b>MAP</b>	Microtubule associated protein
<b>MAP3K</b>	MAPK kinase kinase
<b>MAP4K</b>	MAPK kinase kinase kinase
<b>MAPK</b>	Mitogen-associated protein kinase
<b>MAPK/ERK</b>	Voie de signalisation des MAPK médiée par ERK
<b>MAPK/JNK</b>	Voie de signalisation des MAPK médiée par JNK
<b>MAPKAPK</b>	MAPK-activated protein kinases
<b>MAPKK</b>	MAPK kinase
<b>MCF10A</b>	Lignée de cellules épithéliales de glande mammaire
<b>MEC</b>	Matrice extracellulaire
<b>MEF</b>	Fibroblaste embryonnaire de souris
<b>MEF2C</b>	Myocyte enhancer factor 2c
<b>MEK</b>	Mitogen-activated protein kinase kinase
<b>MMP13</b>	Métallopeptidase matricielles 13
<b>MMP9</b>	Métallopeptidase matricielles 9
<b>mTORC1</b>	Mammalian target of rapamycin complex 1
<b>mTORC2</b>	Mammalian target of rapamycin complex 2
<b>MYH14</b>	Myosin heavy chain 14
<b>NCAD</b>	N-cadherin
<b>NCAM1</b>	Neural cell adhesion molecule 1
<b>NGF</b>	Facteur de croissance nerveuse
<b>NKX3-2</b>	NK3 homeobox 2
<b>NRAS</b>	Neuroblastoma RAS proto-oncogene
<b>OCN</b>	Ostéocalcine
<b>OCRL1</b>	Inositol polyphosphate-5-phosphatase oculocerebrorenal syndrome of Lowe protein 1
<b>OPN</b>	Ostéopontine
<b>OPS</b>	Opsismodysplasie
<b>OSBP</b>	Oxysterol-binding protein
<b>OSX</b>	Osterix
<b>p110</b>	Sous-unité catalytique de la PI3K
<b>p38 MAPK</b>	Voie de signalisation des MAPK médiée par p38
<b>p85</b>	Sous-unité régulatrice de la PI3K
<b>PAM16</b>	Presequence translocase-associated motor 16
<b>PAX1</b>	Paired box 1

<b>PDGF</b>	Platelet-derived growth factor
<b>PDGFR</b>	Récepteur des facteurs de croissance dérivés des plaquettes
<b>PK1</b>	Kinase dépendante de phosphoinositide 1
<b>PK2</b>	Kinase dépendante de phosphoinositide 2
<b>PEPCK</b>	Phosphoénolpyruvate carboxykinase
<b>PGK</b>	Phosphoglycérate kinase
<b>PH</b>	Domaines homologues de la pleckstrine
<b>PHLPP</b>	PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase 1
<b>PHOSPHO1</b>	Phosphoethanolamine/Phosphocholine Phosphatase 1
<b>Pi</b>	Phosphate inorganique
<b>PI</b>	Phosphoinositides
<b>PI(3)P</b>	Phosphatidylinositol-3-phosphate
<b>PI(3,4)P2</b>	Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate
<b>PI(3,4,5)P3 ou PIP3</b>	Phosphatidylinositol-3,4,5-bisphosphate
<b>PI(3,5)P2</b>	Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate
<b>PI(4)P</b>	Phosphatidylinositol-4-phosphate
<b>PI(4,5)P2 ou PIP2</b>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
<b>PI(5)P</b>	Phosphatidylinositol-5-phosphate
<b>PI3K</b>	Phosphoinositide 3-kinase
<b>PI3K/AKT</b>	Voie de signalisation PI3K/AKT
<b>PI4K</b>	Phosphatidylinositol 4-Kinase
<b>PIK3CA</b>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha
<b>PIP4K</b>	Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase
<b>PIP5K</b>	Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase
<b>PIPP</b>	Proline rich inositol polyphosphate 5-phosphatase
<b>PIPT</b>	Phosphatidylinositol transfer protein
<b>PKC</b>	Protéine kinase C
<b>PLC</b>	Phosphoinositide-specific phospholipase C
<b>PLC/ IP3 /DAG</b>	Voie de signalisation PLC/ IP3 /DAG
<b>PLC<math>\gamma</math></b>	Phospholipase C $\gamma$
<b>PPA2</b>	Protéine phosphatase A2
<b>PPi</b>	Pyrophosphate
<b>PRX1</b>	Paired related homeobox 1
<b>PTB</b>	Phosphotyrosine binding
<b>PTCH1</b>	Patched 1
<b>PTCH2</b>	Patched 2
<b>PtdIns</b>	Phosphatidylinositol
<b>PTEN</b>	Tensin homologue deleted on chromosome 10
<b>PTH1R</b>	Parathyroid hormone 1 receptor
<b>PTHrP</b>	Parathyroid hormone-related peptide
<b>PTPN11</b>	Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11
<b>RAF</b>	Raf-1 proto-oncogene
<b>RAF1</b>	RAF-1 proto-oncogene
<b>RAS</b>	Rat sarcoma viral oncoprotein
<b>RCS</b>	Swarm rat chondrosarcoma
<b>RE</b>	Réticulum endoplasmique

<b>ROS</b>	Reactive oxygen species
<b>RTK</b>	Récepteur tyrosine kinase
<b>RUNX2</b>	Runt-related transcription factor 2
<b>RUNX3</b>	Runt-related transcription factor 3
<b>S473</b>	Sérine 473 d'AKT
<b>SAM</b>	Sterile alpha motif
<b>SBDS</b>	Shwachman–Bodian–Diamond syndrome ribosome maturation factor
<b>SCX</b>	Scleraxis BHLH transcription factor
<b>SEC2</b>	Facteur d'échange de protéines
<b>SEMA3C</b>	Semaphorin 3C
<b>SEMA3D</b>	Semaphorin 3D
<b>SH2</b>	Src homology 2 domain
<b>SH2B1</b>	SH2B adaptator protein 1
<b>SH3</b>	SRC homology 3 domain
<b>SHC</b>	Src homology 2 domain containing transforming protein 1
<b>SHH</b>	Sonic hedgehog Signaling Molecule
<b>SHIP1</b>	SH2 domain-containing inositol 5-phosphatase 1
<b>SHIP2</b>	SH2 domain-containing inositol 5-phosphatase 2
<b>SHIP2 Δ</b>	Protéine SHIP2 tronquée de 57 acides aminés générée par Dubois (2012)
<b>shRNA</b>	Short hairpin RNA
<b>siRNA</b>	Petits ARN interférents
<b>SKICH</b>	SKIP carboxyl homology domain
<b>SKIP</b>	Skeletal muscle and kidney enriched inositol phosphatase
<b>SKP2</b>	S-phase kinase-associated protein 2
<b>SLC35D1</b>	Solute carrier family 35 member D1
<b>SMAD1</b>	Smad family member 1
<b>SMAD5</b>	Smad family member 5
<b>SMAD8</b>	Smad family member 8
<b>SMO</b>	Smoothened
<b>SNX5</b>	Sorting nexine 5
<b>SNX9</b>	Sorting nexine 9
<b>SOS</b>	Son of sevenless
<b>SOX5</b>	SRY-Box transcription factor 5
<b>SOX6</b>	SRY-Box transcription factor 6
<b>SOX9</b>	SRY-Box transcription factor 9
<b>SPRY1</b>	Sprouty RTK signaling antagonist 1
<b>SPRY2</b>	Sprouty RTK signaling antagonist 2
<b>SRC</b>	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
<b>SYNJ</b>	Famille des synaptojanines
<b>SYNJ1</b>	Synaptojanine 1
<b>SYNJ2</b>	Synaptojanine 2
<b>T308</b>	Thréonine 308 d'AKT
<b>TAPP1</b>	Tandem PH domain-containing protein 1
<b>TAPP2</b>	Tandem PH domain-containing protein 2
<b>TEC</b>	Tyrosine protéine kinase TEC
<b>TGF-Beta1</b>	Transforming growth factor beta 1

<b>TNAP</b>	Phosphatase alcaline
<b>TNC</b>	Tenascin-C
<b>TNF-Alpha</b>	Tumor necrosis factor
<b>TRIP11</b>	Récepteur de l'hormone thyroïdienne interacteur 11
<b>TSC2</b>	Ubiquitous sclerosis complex 2
<b>UDP-acide glucuronique</b>	Uridine diphosphate-acide glucuronique
<b>UDP-N-Acétalgalactosamine</b>	Uridine diphosphate-N-Acétalgalactosamine
<b>VEGFA</b>	Vascular endothelial growth factor A
<b>WASP</b>	Wiskott-aldrich syndrome protein
<b>WNT</b>	Wingless integration site

<b>RESUME - ABSTRACT .....</b>	<b>1</b>
<b>PREAMBULE GENERAL .....</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>9</b>
<b>1 L'OSTÉOGENÈSE .....</b>	<b>11</b>
1.1 Condensations mésenchymateuses .....	11
1.2 Ossification intramembraneuse .....	12
1.3 Ossification endochondrale .....	13
1.3.1 Elaboration de la maquette cartilagineuse .....	14
1.3.2 Centres d'ossification .....	17
1.3.3 Plaque de croissance .....	18
1.3.4 Fin de la croissance .....	29
<b>2 L'OPSISMODYSPLASIE .....</b>	<b>31</b>
2.1 Description .....	31
2.2 Signes cliniques, radiologiques et histologiques .....	35
2.3 Etiologie .....	37
2.4 Classification .....	39
<b>3 LIPIDES ET SIGNALISATION CELLULAIRE .....</b>	<b>45</b>
3.1 La voie de signalisation PI3K/AKT .....	45
3.2 La voie de signalisation MAPK/ERK .....	50
3.3 Cross-talk entre les voies PI3K/AKT et MAPK/ERK .....	54
3.4 Phosphoinositides .....	54
3.4.1 PI(4,5)P <sub>2</sub> .....	56
3.4.2 PI(4)P .....	58
3.4.3 PI(3,4,5)P <sub>3</sub> .....	58
3.4.4 PI(3,4)P <sub>2</sub> .....	59
3.5 Famille des inositol polyphosphate 5-phosphatases .....	60
3.5.1 Généralités .....	60

3.5.2	OCRL1.....	62
3.5.3	INPP5B.....	63
3.5.4	SYNJ1/2.....	63
3.5.5	INPP5J/PIPP.....	64
3.5.6	INPP5K/SKIP.....	64
3.5.7	INPP5E.....	65
3.5.8	SHIP1/2.....	66
<b>4</b>	<b>LA SOURIS SHIP2<sup>Δ/Δ</sup>.....</b>	<b>75</b>
4.1	Origine.....	75
4.2	Caractéristiques.....	76
	<b>OBJECTIFS.....</b>	<b>79</b>
	<b>SECTION EXPERIMENTALE.....</b>	<b>83</b>
	<b>DISCUSSION - PERSPECTIVES.....</b>	<b>115</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>135</b>
	<b>ANNEXE.....</b>	<b>161</b>



---

# Résumé - Abstract

---



## Résumé

L'opsismodysplasie est une chondrodysplasie squelettique autosomale récessive rare caractérisée par un nanisme comprenant des membres raccourcis, une macrocéphalie et une dysmorphie faciale. Le devenir des patients est variable, allant de la mortalité périnatale jusqu'à permettre à certains individus de dépasser la vingtaine. Les anomalies radiographiques regroupent des os longs raccourcis avec une minéralisation épiphysaire sévèrement retardée, des malformations métaphysaires, des métacarpiens et phalanges raccourcis, une platyspondylie sévère, un thorax étroit. Les études histologiques des os de patients opsismodysplasiques sont peu nombreuses mais ont néanmoins pu mettre en évidence des altérations spécifiques de la plaque de croissance. Dans la zone de réserve, les chondrocytes germinaux sont plus nombreux et apparaissent désorganisés. Au sein de la zone proliférative, on observe une quasi-absence d'organisation en colonne des chondrocytes prolifératifs. La zone hypertrophique est réduite en taille et présente un nombre significativement réduit de cellules hypertrophiques. Enfin, les trabécules osseuses sont décrites comme épaissies, raccourcies et irrégulières. Ces altérations ont été observées chez tous les patients opsismodysplasiques étudiés mais avec une grande variabilité dans leur intensité. En 2013, un groupe de chercheurs a découvert que près de 60% des patients opsismodysplasiques présentent des mutations homozygotes ou hétérozygotes dans le gène *INPPL1* codant pour la protéine SHIP2. Plus de 25 mutations différentes ont été identifiées chez les patients opsismodysplasiques dont des mutations non-sens, *in-frame*, *missense*, *frame-shift* et par site d'épissage. Bien que la plupart d'entre elles soient prédites pour altérer sévèrement voire inactiver complètement la fonction catalytique de SHIP2, le mécanisme sous-jacent est actuellement inconnu.

Afin d'investiguer la fonction de SHIP2 dans le cadre de l'ossification endochondrale, nous avons utilisé dans notre étude une souris SHIP2<sup>Δ/Δ</sup> exprimant un taux réduit de protéine SHIP2 catalytiquement inactive et un inhibiteur de l'activité 5-phosphatase de la protéine. Premièrement, comme observé chez les patients opsismodysplasiques, l'inactivation catalytique de SHIP2 chez la souris induit une réduction de la taille du corps, une réduction des os longs, un dysmorphisme cranio-facial, une réduction de la taille de la zone hypertrophique et des anomalies dans la minéralisation de la plaque de croissance. Deuxièmement, les anomalies osseuses intrinsèques liées à la présence de la protéine SHIP2  $\Delta$  sont suffisantes pour induire *in-vitro* les altérations caractéristiques de l'opsismodysplasie sur la croissance osseuse, l'histologie et la minéralisation. Troisièmement, l'expression de l'ostéocalcine est augmentée lorsque SHIP2 est inactivé dans des chondrocytes primaires en culture et de manière concomitante avec la diminution de la formation de nodules minéralisés. Le ciblage de l'ARNm de l'ostéocalcine par un shRNA spécifique augmente la production de nodules minéralisés. Quatrièmement, comparé aux échantillons contrôles, les niveaux de phosphorylation de MEK et ERK1/2 sont significativement augmentés lorsque l'activité catalytique de SHIP2 est inactivée dans des chondrocytes primaires traités avec du sérum et de l'IGF1, mais pas avec du FGF2. Le traitement des chondrocytes et des métatarses

en culture avec un inhibiteur de la phosphorylation de MEK rétablit partiellement la formation de nodules minéralisés, la taille de la zone hypertrophique et la croissance osseuse, permettant d'envisager un jour un traitement qui pourrait permettre de réduire le phénotype observé. Ensemble, ces résultats indiquent que les souris SHIP2<sup>Δ/Δ</sup> représentent un modèle pertinent pour l'opsismodysplasie et que la majorité des anomalies pourrait être expliquée par une perte de contrôle de la voie MAPK/ERK. Ils permettent de souligner le rôle de SHIP2 dans la différenciation des chondrocytes durant l'ossification endochondrale, notamment en tant qu'inhibiteur de la voie MAPK/ERK. Finalement, cette thèse ouvre des perspectives de travail intéressantes dans la recherche thérapeutique dans le cadre de l'opsismodysplasie humaine.

## Summary

Opsismodysplasia is a rare recessive skeletal autosomal chondrodysplasia characterized by dwarfism including shortened limbs, smaller hands and feet, macrocephaly and facial dysmorphism. The fate is variable, ranging from perinatal mortality to allow some individuals to exceed twenty. The radiographic abnormalities include shortened long bones with severely delayed epiphyseal mineralization, metaphyseal malformations, shortened metacarpals and phalanges, severe platyspondyly and a narrow chest. Histological studies performed on bones of opsismodysplastic patients are few but have nevertheless been able to highlight specific alterations in the growth plate. In the resting zone, germinal chondrocytes are more numerous and appear disorganized. Within the proliferative zone, there is nearly absence of columnar organization of proliferative chondrocytes. The hypertrophic area is reduced in size and has a significantly reduced number of hypertrophic cells. Finally, the bone trabeculae are described as thickened, shortened and irregular. These alterations were observed in all patients studied, but with great variability in intensity. In 2013, a group of researchers discovered that almost 60% of opsismodysplastic patients present homozygous or heterozygous mutations in the *INPPL1* gene coding for the protein SHIP2. More than 25 different mutations have been identified in opsismodysplastic patients including nonsense, in-frame, missense, frame-shift and splice site mutations. Although most of them are predicted to severely alter or even completely inactivate the catalytic function of SHIP2, the underlying mechanism is currently unknown.

In order to investigate the function of SHIP2 in endochondral ossification, we used in our study a SHIP2<sup>Δ/Δ</sup> mouse expressing a reduced level of catalytically inactive SHIP2 protein and an inhibitor of the protein 5-phosphatase activity. First, as seen in opsismodysplastic patients, catalytic inactivation of SHIP2 in mice induces a reduction in body size and in long bones, a craniofacial dysmorphism, reduction of the size of the hypertrophic zone and abnormalities of the mineralization of the growth plate. Second, the presence of the protein SHIP2  $\Delta$  is sufficient to induce *in vitro* intrinsic bone alterations of opsismodysplasia. Third, the expression of osteocalcin is increased when SHIP2 is inactivated in primary chondrocytes in culture and concomitantly with the decrease in the formation of mineralized nodules. Targeting osteocalcin mRNA with a specific shRNA increases the production of mineralized nodules. Fourth, phosphorylation levels of MEK and ERK1/2 are significantly increased when the catalytic activity of SHIP2 is inactivated in primary chondrocytes treated with serum and IGF1, but not with FGF2, compared to controls. Treatment of chondrocytes and metatarsals with an inhibitor of MEK phosphorylation partially restores the formation of mineralized nodules, the size of the hypertrophic zone and bone growth, allowing one day a potential treatment. Together, these results indicate that SHIP2<sup>Δ/Δ</sup> mice represent a relevant model for opsismodysplasia and that the majority of these abnormalities could be explained by dysregulation of the MAPK/ERK pathway. They underline the role of SHIP2 in chondrocytes differentiation during endochondral ossification, as an inhibitor of the

MAPK/ERK pathway. Finally, this thesis opens up interesting work perspectives in therapeutic research in the context of human opsismodysplasia.

---

# Préambule général

---





Depuis sa première description en 1977, l'opsismodysplasie a été décrite chez près d'une trentaine de patients. Pendant plusieurs dizaines d'années, aucun des cas rapportés n'a permis d'en isoler son origine. Bien qu'extrêmement rare, l'attention portée par la communauté scientifique envers cette chondrodysplasie très spécifique a fait un bon en avant lorsqu'en 2013 plusieurs groupes de chercheurs ont avancé une hypothèse sur l'étiologie de cette maladie. L'identification de mutations affectant le gène *INPPL1* chez plus de la moitié des patients atteints a ouvert de nouvelles perspectives de recherche afin de peut-être un jour comprendre le mécanisme à l'origine de cette forme très sévère de nanisme.

Coinjointement à cette avancée, un groupe de chercheurs a généré une souris génétiquement modifiée exprimant une protéine mutante de SHIP2 dans le but d'étudier les fonctions de cette enzyme. Il se trouve que cette souris SHIP2 présente plusieurs traits phénotypiques se rapprochant fortement des anomalies identifiées chez les patients opsismodysplasiques.

Par conséquent, l'objet de cette thèse est d'étudier les effets de l'expression d'une protéine SHIP2 catalytiquement inactive sur l'ossification endochondrale dans le modèle murin SHIP2<sup>Δ/Δ</sup> afin de comprendre les mécanismes à l'origine des anomalies squelettiques rencontrées. Ce travail permet également de définir si le modèle murin SHIP2<sup>Δ/Δ</sup> peut servir de modèle afin d'étudier l'opsismodysplasie humaine. L'introduction présentée ci-dessous vise à donner une vue d'ensemble des différentes notions théoriques indispensables pour comprendre d'un point de vue scientifique l'intérêt de l'hypothèse de départ et la portée potentielle des réponses observées.



---

# Introduction

---



# 1 L'OSTÉOGENÈSE

L'ostéogenèse désigne l'ensemble des phénomènes contribuant à la formation d'un os en tant qu'organe. C'est un processus complexe dont les rouages restent encore mal compris. Le squelette regroupe l'ensemble des os des vertébrés. Il peut être divisé en deux parties : le squelette axial comprenant les os du crâne, la colonne vertébrale et la cage thoracique, et le squelette appendiculaire reprenant les os des membres, les épaules et le bassin pelvien.

Les os du squelette peuvent être répartis en cinq groupes. Les os longs regroupent ceux dont au moins une de leur dimension est largement plus grande que les autres, comme les os des membres qui participent à la mobilité. Les os courts s'apparentent à un cube (os du carpe et du tarse). Les os plats ont au moins une des dimensions très réduite, typiquement les os du crâne et le sternum. Les os sésamoïdes permettent de protéger les tendons contre leur usure prématurée. Enfin, le groupe des os irréguliers intègrent les os qui ne rentrent dans aucune des catégories précitées tels que les os de la colonne vertébrale et du bassin (Clarke, 2008).

Bien qu'en apparence inerte et rigide, l'os est un tissu très dynamique qui permet au squelette de remplir cinq fonctions primaires des vertébrés supérieurs : (1) le squelette permet la mobilité corporelle en fournissant aux muscles le support nécessaire à la réalisation des mouvements. (2) Il fournit une protection rigide des organes vitaux, du cerveau et de la moelle épinière. (3) Il intervient dans l'homéostasie et le stockage du calcium (98% du  $\text{Ca}^{2+}$ ), intervient dans le métabolisme du phosphore et de la vitamine D via le *Fibroblast growth factor 23* (FGF23) et régule un ensemble d'autres ions essentiels dans la régulation des fluides extracellulaires (Huesa et al., 2011; Payne & Walker, 1979; Wesseling-Perry, 2010). (4) Les os contiennent la moelle osseuse et participent à l'hématopoïèse en fournissant les cellules stromales et des niches ostéogéniques qui interagissent avec les précurseurs hématopoïétiques. (5) Enfin le squelette intervient dans l'homéostasie du glucose et de l'insuline (Maes & Kronenberg, 2012).

La régulation de l'ostéogenèse est réalisée par des facteurs de croissance produits de manière autocrine et paracrine au sein de la matrice extracellulaire (MEC). Cette régulation est complexe car un facteur de croissance peut avoir des effets différents voire opposés en fonction du degré de différenciation de la cellule sur lequel il agit.

## 1.1 Condensations mésenchymateuses

Chez l'homme, le squelette se crée par la formation coordonnée de plus de 200 os distribués dans l'ensemble du corps. Le squelette embryonnaire est formé dans un premier temps et le squelette adulte dans un second temps. Bien que la structure finale soit semblable, tous les os ne sont pas élaborés de la même manière. Deux mécanismes distincts sont responsables de leur développement : l'ossification intramembraneuse et l'ossification endochondrale. Le point de départ commun à ces deux processus

d'ossification est l'élaboration d'une maquette mésenchymateuse à l'emplacement des futures structures osseuses. Les cellules qui composent le squelette vertébré dérivent de trois lignées embryologiques.

Les cellules de la crête neurale donnent naissance à des dérivés des arcs branchiaux du squelette craniofacial. Les cellules du mésoderme paraxial contribuent au squelette craniofacial et à la majeure partie du squelette axial par la formation de sclérotomes. Enfin, les cellules qui composent le mésoderme latéral contribuent à la formation du squelette appendiculaire (Mackie et al, 2008).

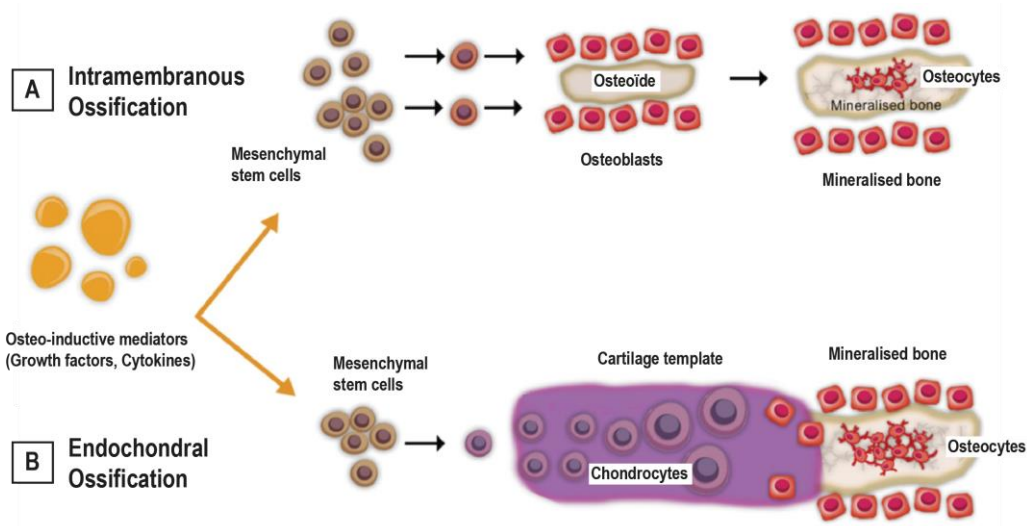
A (E) 10.5 chez la souris, des cellules mésenchymateuses s'aggrègent pour former des condensations cellulaires à haute densité, nodulaires, non encapsulées et non vascularisées appelées ébauches mésenchymateuses (Hata et al., 2017; Karsenty et al., 2009). Elles déterminent les contours des éléments constituant le futur squelette. Au cours de ce processus, d'importants changements ont lieu dans la MEC, autorisant les interactions cellulaires et l'activation de voies de signalisation régulant la différenciation cellulaire. Les cellules mésenchymateuses représentent les progéniteurs communs aux chondrocytes et ostéoblastes. Elles produisent une matrice extracellulaire composée essentiellement de collagène de type I alpha 1 (COL1A1). Les marqueurs caractérisant les cellules mésenchymateuses sont *SRY-Box transcription factor 9* (SOX9), collagène de type II alpha 1 (COL2A1), *N-Cadherin* (NCAD), *Neural cell adhesion molecule 1* (NCAM1) et *Tenascin-C* (TNC) (Zuscik et al., 2008). Le mécanisme régulant la condensation des cellules mésenchymateuses n'a pas encore été éclairci, mais il ferait intervenir les facteurs *Bone morphogenetic protein* (BMP), car la délétion des facteurs *Bone morphogenetic protein 2* (BMP2) et *Bone morphogenetic protein 4* (BMP4) via le promoteur *Paired related homeobox 1* (PRX1) empêche la condensation des cellules mésenchymateuses chez des souris (Bandyopadhyay et al., 2006; Hata et al., 2017). Plusieurs études ont également mis en évidence l'importance des facteurs *Fibroblast-growth factor* (FGF), car l'absence du récepteur cible, le *Fibroblast-growth factor receptor 2* (FGFR2), empêche la formation de cartilage (Yu & Ornitz, 2008).

## 1.2 Ossification intramembraneuse

Ce processus d'ossification concerne essentiellement les os plats de la calvaria, la mandibule, le maxillaire et les couches sous-périostées des os longs (Provot & Schipani, 2005). La formation des os membraneux se déroule par métaplasie directe du tissu mésenchymateux en tissu osseux, sans maquette cartilagineuse préalable (Figure 1).

Au cours de l'embryogenèse, des centres d'ossification dispersés apparaissent dans les feuillets mésenchymateux. Sous l'action de signaux de régulation provenant de peptides de la famille des *Wingless integration site* (WNT), *Hedgehog* (HH) et de facteurs de croissance FGF, les cellules mésenchymateuses s'alignent sur des fibres de collagène pour amorcer une différenciation ostéoblastique et se différencier directement en ostéoblastes qui synthétisent une matrice osseuse fibreuse (ostéoïde) (Provot & Schipani, 2005). Ce processus est réalisé en collaboration avec du tissu vasculaire (Maes & Kronenberg, 2016) qui colonise progressivement les condensations

mésenchymateuses sous l'action de facteurs pro- et anti-angiogéniques, comme le facteur de croissance *Vascular endothelial growth factor A* (VEGFA) sécrété par les cellules endothéliales et les ostéoblastes. L'ossification va progresser de proche en proche à partir du centre. Les ostéoblastes se retrouvent alors emmurés et prennent le nom d'ostéocytes. Il y a formation de travées osseuses indépendantes qui finissent par se rejoindre pour former un réseau, donnant l'aspect spongieux à l'os. L'os fibreux est finalement résorbé et remplacé par du tissu osseux lamellaire. A noter que l'ossification intramembraneuse se produit également en cas de réparation osseuse, comme après une fracture par exemple. Parallèlement à ces événements, des cellules mésenchymateuses du péri-chondre expriment le facteur *Runt-related transcription factor 2* (RUNX2) et *Osterix* (OSX) ce qui leur permet de se différencier directement en ostéoblastes par ossification intramembraneuse (Maes & Kronenberg, 2016; Zhou et al., 2014).



**Figure 1 : Représentation des deux types principaux d'ossification** (Andrzejowski & Giannoudis, 2019). **A.** Ossification intramembraneuse. Des médiateurs ostéo-inducteurs induisent la différenciation directe des cellules souches mésenchymateuses (MSC) en ostéoblastes responsables du dépôt de tissu ostéoïde riche en collagène de type I dans la matrice extracellulaire (MEC). Le tissu ostéoïde va être minéralisé pour devenir du tissu osseux et devenir un centre d'ossification à partir duquel la minéralisation va s'étendre. **B.** Ossification endochondrale. Des médiateurs ostéo-inducteurs induisent la différenciation de cellules souches mésenchymateuses (MSC) en chondrocytes qui synthétisent une MEC cartilagineuse riche en collagène de type II dans le but de former une maquette cartilagineuse. Cette ébauche va être remplacée ultérieurement par du tissu osseux synthétisé par des ostéoblastes. Adapté de (Andrzejowski & Giannoudis, 2019).

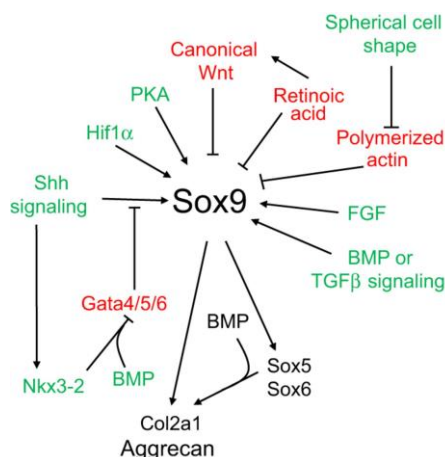
### 1.3 Ossification endochondrale

Ce processus d'ossification est quant à lui responsable de l'élaboration du reste du squelette, à savoir le squelette axial (os de la base du crâne, vertèbre et côtes) et le squelette appendiculaire (membres). A la différence de l'ossification intramembraneuse, la maquette mésenchymateuse est

d'abord remplacée par une maquette cartilagineuse avant que le tissu osseux ne la remplace et termine la croissance osseuse (Figure 1). L'ossification endochondrale diffère également en fonction du type d'os (long, court,...) pour lesquels on observe des différences quant à l'apparition des centres d'ossification (Aghajanian & Mohan, 2018).

### 1.3.1 Elaboration de la maquette cartilagineuse

Pour former la maquette cartilagineuse intermédiaire, les cellules mésenchymateuses doivent acquérir des compétences chondrogéniques caractérisées notamment par l'expression du facteur SOX9 (Figure 2). Celui-ci est un régulateur important de la chondrogenèse. Son rôle a notamment été mis en évidence par la création de souris chimériques à base de cellules SOX9-null et SOX9 wild-type. Les cellules SOX9-null sont exclues de la condensation mésenchymateuse et les cellules qui en dérivent ne forment pas de cartilage (Bi et al., 1999). L'absence totale de SOX9 induit par ailleurs une létalité périnatale (Bi et al., 2001). Ce facteur induirait des modifications de la chromatine de façon à réguler des gènes impliqués dans la condensation précartilagineuse (FAM101A, MYH14, SEMA3C et SEMA3D) et activer des promoteurs spécifiques du cartilage. Néanmoins, de récentes découvertes remettent en question son rôle par le fait qu'il serait dispensable dans son action initiatrice et activatrice. L'expression de ce facteur est acquise différemment par les cellules mésenchymateuses du squelette axial et celles du futur squelette appendiculaire (Liu, Angelozzi, et al., 2018).

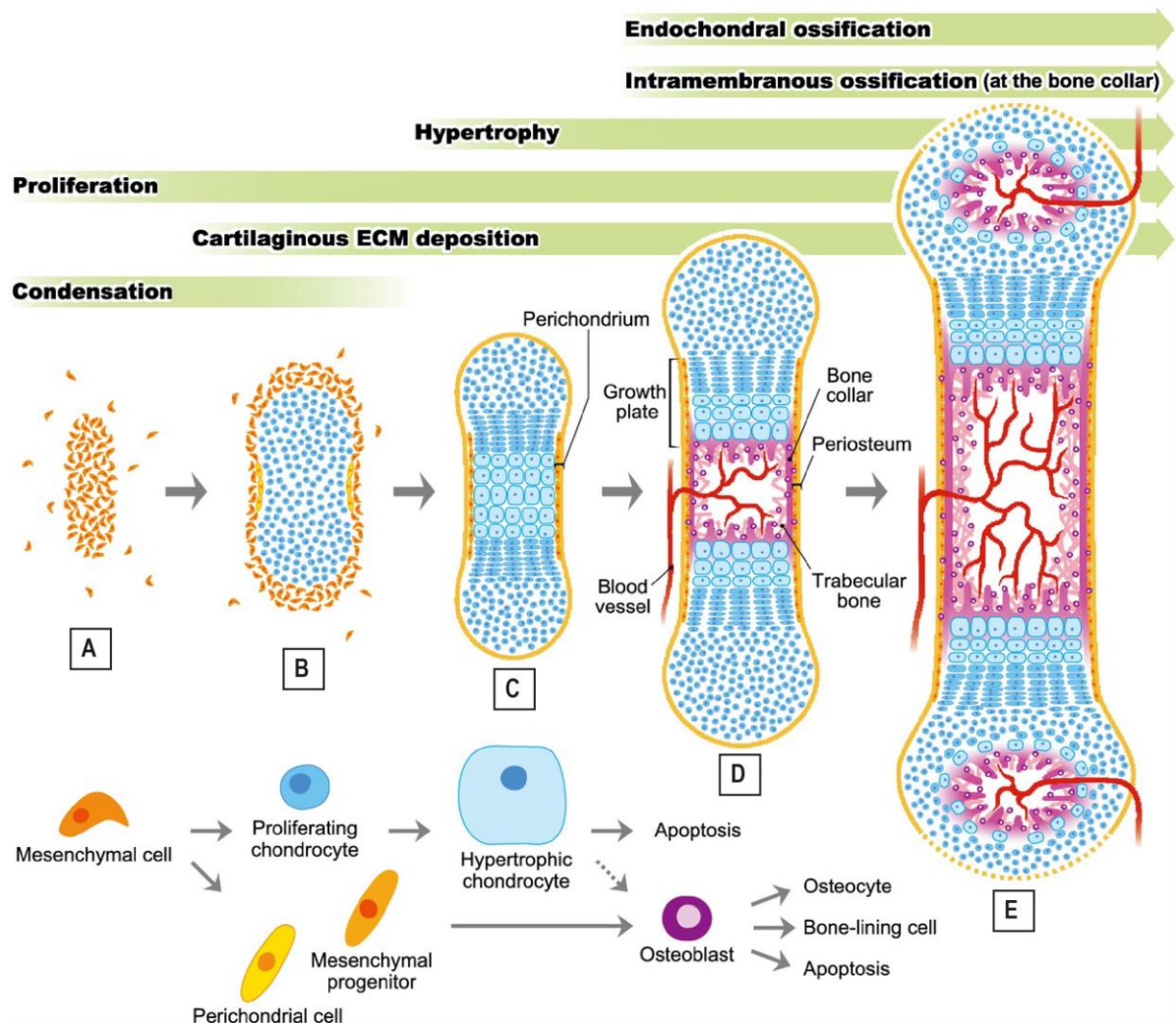


**Figure 2 : Voies de signalisation régulant l'expression et l'activité de SOX9 durant la chondrogenèse** (Kozhemyakina et al., 2015). Les signaux connus pour activer l'expression de SOX9 ou son activité sont représentés en vert. Les signaux inhibiteurs de son expression sont en rouge. SOX9 et certains de ces effecteurs en aval sont indiqués en noir. BMP, *bone morphogenetic protein*; COL2A1, *collagen, type II α1*; FGF, *fibroblast growth factor*; PKA, *protein kinase A*; SHH, *sonic hedgehog*; TGFβ, *transforming growth factor β*. Source (Kozhemyakina et al., 2015).

Les cellules responsables de l'élaboration du squelette axial acquièrent la compétence chondrogénique par la combinaison des facteurs SOX9 et BMP. Elle est initiée par le facteur *Sonic hedgehog signaling molecule* (SHH) synthétisé à la fois par la notochorde et le tube neural. L'interaction entre SHH et les protéines transmembranaires *Patched 1* (PTCH1) et *Patched 2* (PTCH2) induit la translocation de la protéine transmembranaire *Smoothened* (SMO) près du cil primaire et l'activation des facteurs de transcription *GLI Family Zinc Finger* (GLI). Ceux-ci ont pour fonction de réguler les gènes hedgehog (Kozhemyakina et al., 2015). Une fois que SHH a initié la synthèse de SOX9 (mais aussi *Paired box 1* (PAX1) et *NK3 homeobox 2* (NKX3-2) par les cellules mésenchymateuses, les protéines BMP sont chargées de maintenir sa production (Yoon & Lyons, 2004). Ces facteurs sont essentiels car leur absence engendre une chondrodysplasie majeure chez la souris (Retting et al., 2009). Leur signalisation fait



intervenir les récepteurs *Bone morphogenic protein receptor type 1 and 2* (BMPR1 et BMPR2) menant à la phosphorylation des facteurs de transcription *Smad family member 1, 5, 8* (SMAD1-5-8) (Li & Dong, 2016).



**Figure 3 : Illustration du développement d'un os long** (Egawa et al., 2014). **A.** Durant l'embryogenèse, des cellules mésenchymateuses s'agrègent pour former une condensation pré-cartilagineuse afin de définir les contours du futur os long. **B.** Au centre de cette ébauche et notamment sous l'action du facteur SOX9, des cellules mésenchymateuses se différencient en chondrocytes prolifératifs qui commencent à produire une matrice extracellulaire cartilagineuse (ECM). En périphérie de la maquette cartilagineuse, des cellules mésenchymateuses commencent à se différencier en cellules périchondrales. **C.** Au centre de la maquette et sous l'action du facteur IHH, des chondrocytes subissent une maturation supplémentaire, augmentent de volume et deviennent des chondrocytes hypertrophiques. Ceux-ci produisent une MEC cartilagineuse minéralisée. L'ensemble de la maquette cartilagineuse, y compris la surface articulaire, est entouré par le périchondre, qui forme une double couche au niveau de la région diaphysaire. **D.** Certaines cellules périchondrales de la couche interne du périchondre se différencient en ostéoblastes et forment la virole périchondrale de Ranvier par ossification intramembraneuse. Sous l'action du facteur VEGF-A, la vascularisation envahit l'os en formation par le centre de la diaphyse, transportant la moelle osseuse, des cellules stromales mésenchymateuses et des ostéoclastes. Cette étape définit l'apparition du centre primaire d'ossification. Les chondrocytes prolifératifs, préhypertrophiques et hypertrophiques sont disposés en colonnes. Cette zone

chondrogénique s'appelle la plaque de croissance et a pour rôle l'allongement en longueur de l'os. L'ossification endochondrale se propage en direction des épiphyses. Le péricondre se transforme en périoste le long de la virole péricondrale de Ranvier. Une partie de la population de chondrocytes *late* hypertrophiques subit une mort cellulaire apoptotique et sont remplacés par des ostéoblastes. L'autre partie subsiste et se différencie en cellules de type ostéoblaste. Ces cellules ostéogéniques ont pour rôle de former le tissu osseux, des travées osseuses, et la formation de la cavité médullaire **E**. Une ossification secondaire se produit dans les épiphyses (post-natale chez les rongeurs) et selon la même procédure que le centre primaire d'ossification. Vers cette période, le péricondre disparaît des deux extrémités articulaires et le cartilage articulaire commence à se différencier. L'os croît en longueur jusqu'à la fin de la puberté où la plaque de croissance disparaît à la suite de l'arrêt du renouvellement en chondrocyte, engendrant l'arrêt de la croissance osseuse. Adapté de (Egawa et al., 2014).

Pour les bourgeons des membres, la formation du cartilage serait initiée par SOX9 en combinaison des facteurs antagonistes WNT et FGF. Alors que des signaux WNT synthétisés par le mésenchyme du bourgeon des membres répriment la formation de cartilage ectopique par répression du promoteur de SOX9 via une voie bêta caténine dépendante, des signaux FGF sécrétés par la crête ectodermique apicale contournent l'inhibition induite par les signaux WNT (Kozhemyakina et al., 2015). Ils activent le promoteur de SOX9 via la voie *Mitogen-associated protein kinase* (MAPK) en bloquant la méthylation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) par les signaux WNT, permettent la croissance du bourgeon, maintiennent le pool de précurseurs de chondrocytes et la compétence chondrogénique en l'absence de signaux WNT (Kozhemyakina et al., 2015).

En conséquence, les cellules mésenchymateuses centrales se différencient en chondrocytes prolifératifs immatures qui expriment SOX9, COL2A1, l'aggrécane (ACAN), NKX3-2, PTCH1, *Fibroblast Growth Factor Receptor 3* (FGFR3), et faiblement RUNX2, OSX, VEGFA (Zuscik et al., 2008) (Figure 3A-B). A ce stade, ils se divisent activement, sont responsables de l'allongement de l'ébauche cartilagineuse et de la formation du cartilage hyalin. Les chondrocytes se retrouvent aplatis dans des logettes encerclées de tissus fibreux et de cartilage. L'ensemble forme l'unité fonctionnelle, le chondrone, dans lesquelles les cellules s'y multiplient. L'augmentation de la largeur de la maquette se fait par croissance appositionnelle, et la croissance interstitielle est responsable de la croissance en longueur. SOX9 est le gène clé régulant l'expression des gènes spécifiques aux chondrocytes prolifératifs. En collaboration avec les coactivateurs *SRY-Box Transcription Factor 5 and 6* (SOX5 et SOX6), il forme un complexe transcriptionnel ciblant le promoteur du gène COL2A1 responsable de la synthèse de collagène, régulant des gènes impliqués dans la synthèse de protéoglycanes, FGFR3, RUNX2 et *Runt-related transcription factor 3* (RUNX3) (Hata et al., 2017; Liu, Angelozzi, et al., 2018). A ce stade, l'expression et l'activité de SOX9 sont régulées positivement par les voies de signalisation *Hypoxia inducible factor 1 subunit alpha* (HIF1A), EGF, BMP et *Tumor necrosis factor* (TNF-Alpha). L'activité de SOX9 est régulée négativement par la voie WNT (Li & Dong, 2016).

*Activating transcription factor 4* (ATF4) est un autre facteur de transcription transmembranaire impliqué dans la prolifération et la différenciation des chondrocytes via l'activation des facteurs de transcription

*Indian hedgehog signaling molecule* (IHH). Il est régulé par le niveau de « stress » subi par le réticulum endoplasmique à la suite d'accumulations importantes de protéines dans sa lumière. Cela concerne notamment les chondrocytes immatures qui ont besoin de produire une grande quantité de composants de la MEC en un temps réduit (Hata et al., 2017). IHH est également un facteur important. En régulant le niveau de *Parathyroid hormone-related peptide* (PTHrP), il maintient les chondrocytes au stade prolifératif immature (Aghajanian & Mohan, 2018).

Par conséquent, ces cellules synthétisent du collagène de type II à la place du collagène de type I, de type IX et de type XI, mais aussi des protéoglycanes comme l'aggrécane. Le collagène de type II est une protéine structurale ayant pour fonction de conférer aux tissus une résistance mécanique à l'étirement. Les protéoglycanes sont des protéines très glycosylées jouant le rôle d'éponge en piégeant l'eau et contribuent avec le collagène à l'élasticité du cartilage. Ils interviennent également dans la diffusion de molécules de signalisation (Akkiraju & Nohe, 2015). Les cellules mésenchymateuses situées en périphérie ne vont pas se différencier en chondrocytes mais vont former le périchondre, ébauche du futur périoste osseux. La maquette mésenchymateuse est alors remplacée par une maquette cartilagineuse ovoïde, limitée et non vascularisée où les chondrocytes sont contenus dans des logettes (chondroplastes) (Xie et al., 2014). À l'exception des extrémités périphériques, le futur os est entouré d'une condensation de cellules et fibres conjonctives qui forment le périchondre. Les futures surfaces articulaires se forment suite à l'apparition de cellules exprimant, en conjonction de SOX9, le facteur *Scleraxis BHLH transcription factor* (SCX) induit par le facteur *Transforming growth factor beta 1* (TGF-Beta1) (Scharstuhl et al., 2003; Sugimoto et al., 2013).

La suite de cette section prendra pour exemple le développement d'un os long tel que le fémur.

### 1.3.2 Centres d'ossification

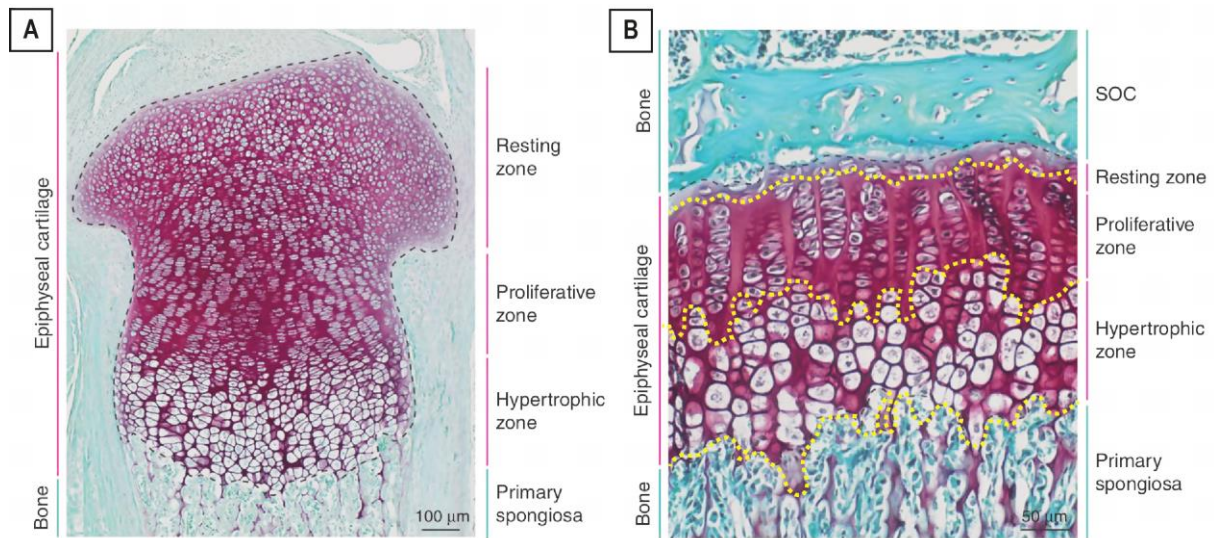
Chez la souris au jour embryonnaire (E) 14.5-15.5, des chondrocytes du centre de la maquette cartilagineuse marquent un changement dans leur phénotype en sortant de la phase proliférative et initiant un processus de différenciation hypertrophique qui caractérise la formation du centre primaire d'ossification (Figure 3C-D). Ce processus se répète également au début de la période postnatale (fin de la 1<sup>ère</sup> semaine), mais cette fois dans les épiphyses afin de former les centres secondaires d'ossification épiphysaire (revue dans (Xing et al., 2014) (Figure 3E). Leur apparition nécessite l'action de l'hormone thyroïdienne qui va induire la synthèse du facteur de croissance IHH promouvant la différenciation des chondrocytes dont la synthèse de collagène de type X. L'absence d'hormone thyroïdienne ou l'utilisation d'inhibiteur de IHH induit l'absence de centre secondaire chez la souris (revue dans (Xing et al., 2014). À noter que l'apparition des centres secondaires ne se réalise pas chez tous les vertébrés, ce qui implique que certains animaux (comme les salamandres et crocodiles) passent leur vie entière avec des épiphyses cartilagineuses (Chagin & Newton, 2019; Xie et al., 2019) car ces zones permettraient de réduire le stress mécanique sur les chondrocytes épiphysaires engendré par le déplacement sur un environnement principalement terrestre (revue dans (Xie et al., 2019).

### 1.3.3 Plaque de croissance

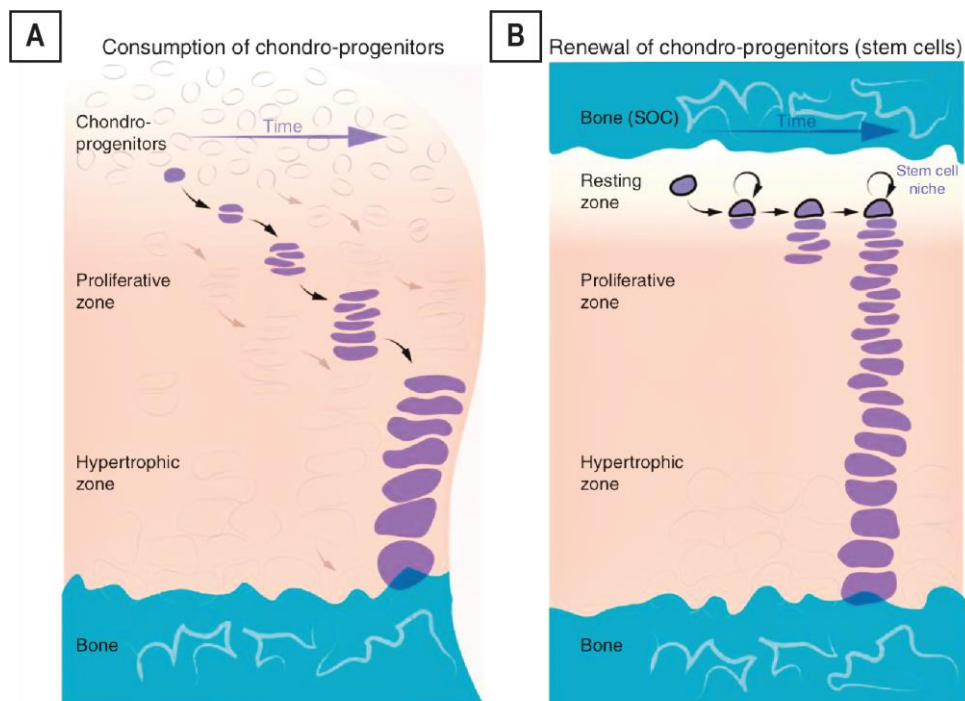
La zone prise en étau entre le centre primaire et les centres secondaires d'ossification porte le nom de plaque de croissance (également appelée métaphyse ou cartilage de conjugaison) (Figure 4). Elle est délimitée par le front d'ossification précédé par la zone hypertrophique (chondrocytes (pré)hypertrophiques), elle-même devançant la zone proliférative (chondrocytes prolifératifs) et la zone de réserve (chondrocytes souches). Cette organisation permet d'un côté de générer un pool de chondrocytes à forte activité mitotique synthétisant progressivement une structure cartilagineuse, d'agrandir l'ébauche du futur os en augmentant la taille des cellules, de consolider cette ébauche en calcifiant la matrice puis de la fixer en la remplaçant finalement par du tissu osseux abritant la moelle osseuse. Cette zone très importante est par conséquent responsable de l'allongement en longueur de l'os durant la période post-natale jusqu'à la fin de la puberté (revue dans (Zuscik et al., 2008).

#### A. Zone de réserve

Les chondrocytes de la zone de réserve expriment SOX9, COL2A1, PTHrP, ACAN et faiblement NKX3-2, PTCH1 et FGFR3. Ils jouent le rôle de cellules souches (chondro-progéniteur), ils ont une forme arrondie, se divisent peu et baignent dans une MEC riche en protéoglycanes. De récentes études ont montré que le mécanisme de génération des chondrocytes est différent en fonction de la période de développement. Durant la période fœtale et néonatale, la génération des chondrocytes est réalisée par le recrutement et la consommation graduelle des chondro-progéniteurs (chondrocytes souches/germinaux). L'apparition des centres secondaires d'ossification marque l'apparition d'une niche de cellules souches épiphysaires au dessus de la zone germinale de la plaque de croissance (Figure 5). La régulation du pool de progéniteurs fait intervenir la voie de signalisation hedgehog et *Mammalian target of rapamycin complex 1* (mTORC1) (Newton et al., 2019). Les chondro-progéniteurs changent leur profil d'expression (PTHrP positif), acquièrent des caractéristiques de cellules souches et commencent à se renouveler, ce qui leur permet de générer des chondrocytes prolifératifs et de maintenir leur population (Chagin & Newton, 2019; Newton et al., 2019).



**Figure 4 : Images de coupes histologiques de la plaque de croissance de souris** (Chagin & Newton, 2019). **A.** Image avant apparition du centre d'ossification secondaire. **B.** Image après apparition du centre d'ossification secondaire (SOC), ce qui permet de mieux définir les limites de la plaque de croissance. Les limites entre les différentes zones qui composent la plaque de croissance ont été mises en évidence avec des pointillés jaunes. Coupes histologiques de la partie proximale du tibia de souris âgées de 3 jours (**A.**) et 30 jours (**B.**), après coloration à la safranine O (rouge ; cartilage) et au Fast Green (vert ; os et tissus de conjugaison). Adapté de (Chagin & Newton, 2019).



**Figure 5 : Illustration des deux mécanismes de génération des chondrocytes de la plaque de croissance** (Chagin & Newton, 2019). Le mécanisme de génération des chondrocytes diffère entre l'âge prénatal et l'âge postnatal. **A.** Durant l'âge prénatal, la croissance osseuse est basée sur la consommation de chondro-progénérateurs. Ceux-ci se différencient en chondrocytes sans se renouveler, diminuant par

conséquent au cours du temps le nombre de chondro-progéniteurs disponibles. **B.** Alors qu'après la naissance lors de l'apparition des centres d'ossification secondaires, les chondro-progéniteurs commencent à se renouveler de façon à maintenir leur population en plus de générer des chondrocytes. C'est la formation d'une niche de cellules souches définissant la zone germinale. Ce changement de mécanisme ferait intervenir les facteurs Sonic hedgehog (SHH) et l'hormone de croissance (GH). Adapté de (Chagin & Newton, 2019).

### B. Zone proliférative

Les chondrocytes prolifératifs contribuent à la zone proliférative. Ces cellules applaties ont une activité métabolique et mitotique intense notamment grâce à la présence abondante d'oxygène. Elles sont disposées en colonnes orientées dans le sens de la croissance dû au fait que chaque cellule souche proche du pôle épiphysaire donne des cellules filles qui se divisent à leur tour. On parle de groupements isogéniques axiaux. Les fibres de collagène de type II sécrétées dans la MEC par les chondrocytes prolifératifs s'orientent progressivement parallèlement aux cellules, formant des septa longitudinaux qui assurent le maintien en colonnes des cellules (Hunziker, 1994; Prein et al., 2016).

### C. Zone hypertrophique

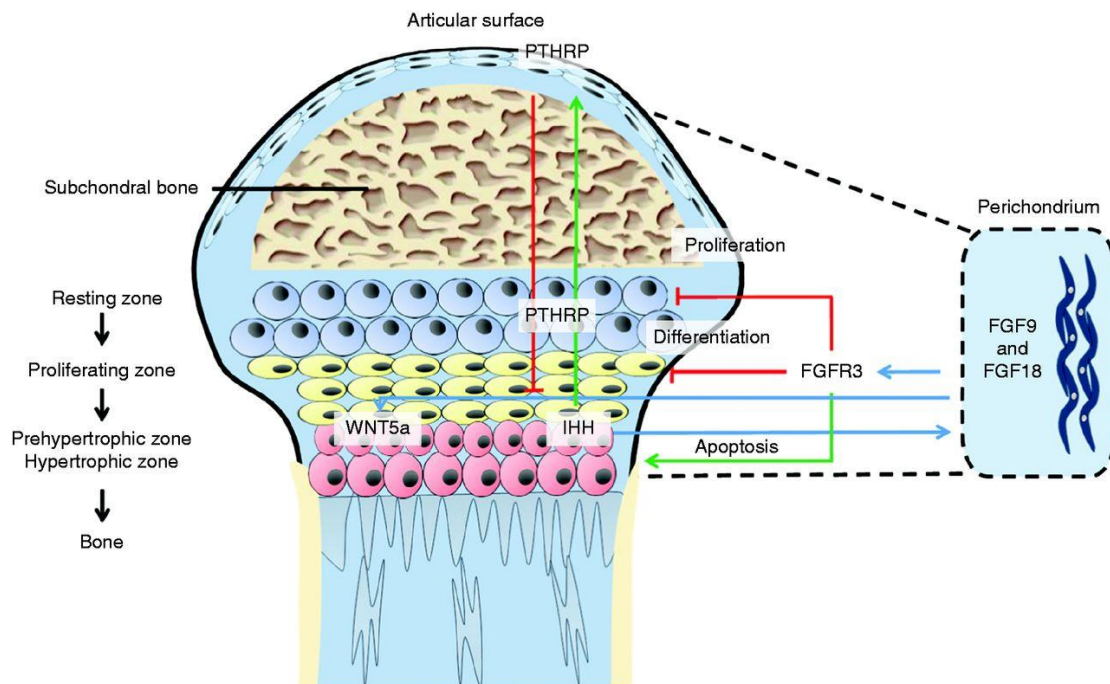
La zone hypertrophique est caractérisée par la présence de chondrocytes hypertrophiques. Cette zone étant avasculaire, les cellules opèrent par métabolisme anaérobie, arrêtent de proliférer, augmentent de volume pour participer à l'augmentation de la taille de l'ébauche osseuse et accumulent des ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ) en vue de minéraliser le cartilage (revue dans (Abad et al., 2002).

En fonction des marqueurs exprimés, la phase d'hypertrophie séquentielle est sous-divisée en phase préhypertrophique, hypertrophique précoce (« *early hypertrophic* ») et hypertrophique terminale (« *late hypertrophic* »). L'initiation de la maturation des chondrocytes prolifératifs en préhypertrophiques est concomitante à l'expression des facteurs IHH et *Parathyroid hormone 1 receptor* (PTH1R) (Li & Dong, 2016) (Figure 6). Ces chondrocytes préhypertrophiques arrêtent de proliférer et ils ont une taille légèrement plus élevée que les chondrocytes prolifératifs. Ils expriment fortement IHH et FGFR3, commencent à exprimer RUNX2-3, OSX, PTH1R, COL10A1 et faiblement VEGFA, COL2A1, ACAN et SOX5-6-9 (Zuscik et al., 2008) (Figure 7).

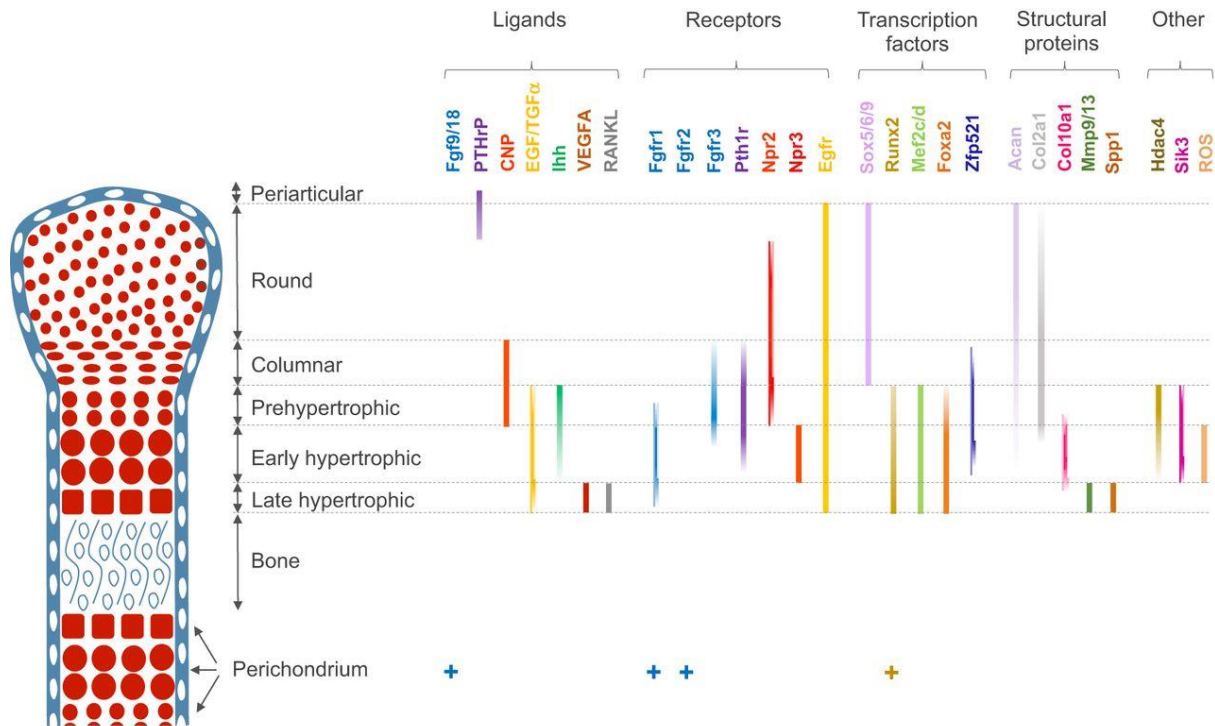
La différenciation des chondrocytes se poursuit, les cellules augmentent encore de volume (10 à 15 fois celui des chondrocytes prolifératifs) et deviennent des chondrocytes hypertrophiques précoces (Farnum et al., 2002). Cette maturation est la conséquence de l'augmentation d'expression de facteurs clés de la famille RUNX (RUNX2-3). Ceux-ci induisent et contrôlent la transcription des gènes impliqués dans l'hypertrophie des chondrocytes et la différenciation ostéoblastique par l'interaction avec les protéines SMAD de la voie des BMD. RUNX2 active par ailleurs directement le promoteur de IHH (Li & Dong, 2016). Les gènes RUNX sont essentiels car la délétion de RUNX2 induit un retard de l'hypertrophie des chondrocytes chez la souris, voire une absence totale de zone hypertrophique et de tissu osseux dans l'ensemble du squelette en cas de double délétion avec RUNX3 (Hata et al., 2017; Takarada et al., 2013).



A cette étape là, les cellules expriment fortement COL10A1, RUNX2-3, VEGFA (Zuscik et al., 2008), mais n'expriment plus COL2A1 et SOX5-6-9. Alors que SOX9 favorise le stade prolifératif, son expression est fortement réduite une fois que les chondrocytes atteignent le stade hypertrophique car ce facteur exerce un rôle inhibiteur sur la maturation par différents moyens : en bloquant la voie de signalisation WNT via la bêta caténine, en bloquant l'activité du facteur de transcription RUNX2, et en réprimant les gènes codant pour COL10A1 et VEGFA (Kozhemyakina et al., 2015; Li & Dong, 2016).



**Figure 6 : Signaux régulateurs de la plaque de croissance** (Xie et al., 2014). La plaque de croissance est divisée en 4 zones distinctes. IHH et PTHrP coordonnent la prolifération et la différenciation des chondrocytes à travers un mécanisme de feed-back négatif. Les chondrocytes préhypertrophiques et hypertrophiques libèrent de l'IHH, ce qui stimule les chondrocytes prolifératifs et la synthèse de PTHrP. La PTHrP synthétisée dans la région périarticulaire/la zone germinale, avant/après la formation du centre secondaire d'ossification inhibe la différenciation des chondrocytes associée à l'IHH. FGF9/18 produits par le périchondre inhibent la prolifération des chondrocytes et leur maturation via FGFR3 durant la vie embryonnaire et la vie post-natale. Certains facteurs WNT exprimés par les chondrocytes de la plaque de croissance stimulent la prolifération chondrocytaires. (Xie et al., 2014).



**Figure 7 : Résumé de l'expression génique régionalisée impliquée dans la plaque de croissance** (Kozhemyakina et al., 2015). Représentation schématique des différentes zones de maturation des chondrocytes dans le cas d'un os long de souris âgées de E15.5-E16.5 et de l'expression des différentes classes de gènes ou protéines impliqués. Source : (Kozhemyakina et al., 2015).

Au fur et à mesure que la maturation des chondrocytes hypertrophiques progresse, ceux-ci voient leurs caractéristiques évoluer. Ils commencent à synthétiser du VEGFA, des métallopeptidases matricielles 9 et 13 (MMP9-13), des phosphatases alcalines (TNAP), de l'ostéopontine (OPN), de l'ostéocalcine (OCN). Contrôlé via par l'histone déacétylase 4 (HDAC4) et le facteur de transcription *Myocyte enhancer factor 2c* (MEF2C), le collagène de type X participe à la minéralisation du cartilage grâce à sa structure et apporte à la maquette cartilagineuse de la rigidité supplémentaire (Hata et al., 2017). TNAP favorise la minéralisation en augmentant la concentration locale en phosphate inorganique, et en diminuant la concentration extracellulaire en pyrophosphate, un inhibiteur de minéralisation (Addison et al., 2007; Golub & Boesze-Battaglia, 2007).

La dernière étape de différenciation représente le stade hypertrophique terminal. A ce stade, les chondrocytes expriment principalement MMP13, *A desintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4* (ADAMTS4) et du VEGFA (Zuscik et al., 2008). MMP13 et ADAMTS4 codent pour des enzymes qui vont contrôler la dégradation de la matrice cartilagineuse. En clivant les protéoglycanes, ces enzymes vont faciliter la minéralisation de la MEC car ces macromolécules jouent le rôle d'inhibiteurs de ce processus. (Aghajanian & Mohan, 2018; Hata et al., 2017; Zuscik et al., 2008).



La plaque de croissance est une zone très active, présentant un turn-over très élevé. En effet, chez la souris, il ne suffit que de 24h pour qu'un chondrocyte réalise sa différenciation complète (du stade prolifératif au stade hypertrophique terminal) et ce indépendamment de la taille des cellules (Cooper et al., 2013). En plus des phénomènes prolifératifs et des dépôts de composés dans la MEC, la phase hypertrophique est de loin la phase qui participe le plus à l'allongement de l'os dans sa longueur (Cooper et al., 2013). Le mécanisme par lequel les chondrocytes augmentent leur volume au sein de la zone hypertrophique est compris depuis seulement quelques années. Ce processus est divisé en trois phases. La phase 1 est de l'hypertrophie vraie car elle consiste en une augmentation du volume (3x) sans dilution du cytoplasme. La masse sèche augmente de manière proportionnelle au volume.

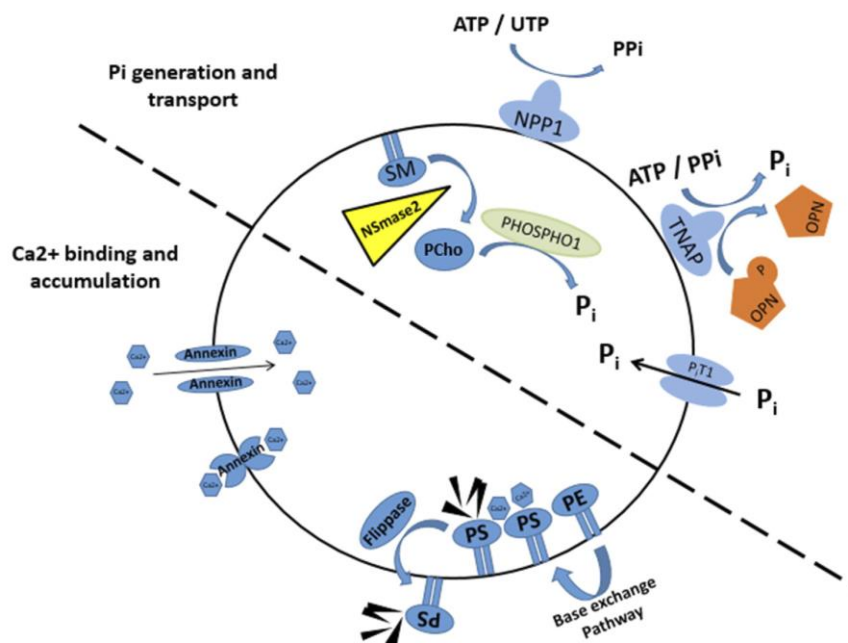
La phase 2 est quant à elle caractérisée par une augmentation de volume (4x) par appel osmotique mais avec diminution de la masse sèche relative, lié au fait que le volume augmente plus vite que la production de masse sèche. L'intérêt de cette phase réside dans le fait qu'elle permet d'obtenir un volume final plus élevé (2-3 fois plus élevé que si elle n'existait pas).

Enfin, en phase 3, le volume continue d'augmenter mais de manière proportionnelle avec la masse sèche. Ce phénomène permet de comprendre comment certains os grandissent plus rapidement que d'autres. En effet, en modulant les différentes phases d'agrandissement du volume cellulaire, la croissance de l'os varie. Par exemple, chez la souris, les chondrocytes hypertrophiques de la plaque de croissance du tibia sont plus volumineux que ceux du radius qui eux ne réalisent pas la phase 3 de l'hypertrophie. En conséquence, le tibia a une croissance plus rapide que celle du radius (Cooper et al., 2013). En revanche, les mécanismes régulateurs influençant l'hypertrophie ou définissant la taille finale de la cellule ne sont pas encore bien connus. Ils feraient intervenir de nombreux facteurs de croissance et de transcriptions comme RUNX2, MEF2C, *RNA binding fox-1 homolog 1* (FOX1), *Insulin like growth factor 1* (IGF1). Le rôle de ce dernier facteur semble un peu plus clair car les souris déficientes en IGF1 présentent des chondrocytes hypertrophiques 30% moins volumineux dus à l'absence de la 3<sup>ème</sup> phase d'hypertrophie, et se traduisant par un retard de croissance de 35% (Cooper et al., 2013; Wang, Zhou, et al., 1999).

#### D. Minéralisation du cartilage

La minéralisation du cartilage est encore mal comprise. Les chondrocytes hypertrophiques minéraliseraient la plaque de croissance à l'aide de vésicules matricielles mesurant 100 à 200 nm et libérées dans l'environnement extracellulaire. Elles permettraient de concentrer les ions dans la MEC et d'induire la formation de cristaux d'hydroxyapatite en particulier (Anderson et al., 2005, 2010; Fedde, 1992; Haimov et al., 2020). Ce phénomène s'observe au départ le long des septa longitudinaux séparant les colonnes puis se concentre au niveau central de celles-ci à cause de la dégénérescence cellulaire. Les septa transverses ne sont par contre pas le site de minéralisation (Sasaki et al., 1996). L'étude des vésicules matricielles à l'origine de ce phénomène n'est pas évidente car il est compliqué de les isoler. Le mécanisme de leur formation est sujet à discussion car plusieurs hypothèses sont à l'étude. L'une d'elle propose que l'hypoxie progressive qui touche les chondrocytes s'emmurant de cartilage les

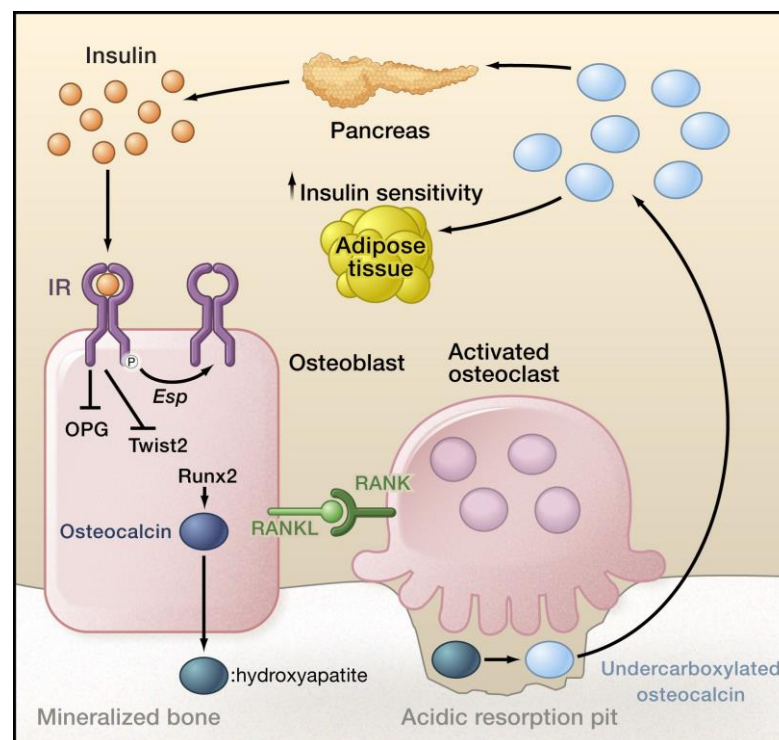
poussent à générer de l'ATP par respiration anaérobie (Shapiro et al., 2015). Le rapprochement avec des vaisseaux sanguins leur fournit une soudaine « bouffée » de nutriments, d'électrolytes et d'oxygène, amenant un stress oxydatif qui va induire la formation de *Reactive oxygen species* (ROS), favorisant la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial dans des vésicules cytoplasmiques. Le  $\text{Ca}^{2+}$  va interagir avec du phosphate inorganique ( $\text{P}_i$ ) et des protéines qui vont relocaliser les vésicules au niveau de la membrane plasmique afin d'être exportées vers la MEC (Cui et al., 2016; Wuthier & Lipscomb, 2011). La formation de cristaux dans les vésicules matricielles est biphasique. La première phase est enzymatique : des phosphatases contenues dans la vésicule (phosphatases alcalines, adénoside triphosphatase, pyrophosphatase, *Phosphoethanolamine/Phosphocholine Phosphatase 1* (PHOSPHO1)) vont favoriser la précipitation des ions sous forme de cristaux insolubles. La deuxième phase comprend la libération des cristaux dans la matrice extracellulaire (Anderson et al., 2005; Cui et al., 2016). Leur capacité de calcification serait dépendante de leur contenu composé essentiellement de protéines et lipides ayant la capacité de chélater le  $\text{P}_i$  et du  $\text{Ca}^{2+}$ . Elle dépend aussi du pH extracellulaire et de la présence de molécules régulatrices (Cui et al., 2016). TNAP est une enzyme chargée de rendre l'environnement extracellulaire des vésicules favorable à la minéralisation. Cette fonction pro-minéralisante provient de la régulation du ratio de pyrophosphate ( $\text{PP}_i$ )/ $\text{P}_i$  et de la modulation de la phosphorylation de l'ostéopontine (OPN) (Addison et al., 2007; Boskey et al., 1993; Whyte, 1994) (Figure 9). Cette dernière est une protéine non-collagénique abondante du tissu osseux qui inhibe la minéralisation en se liant par son résidu phosphorylé *Acidic serine- and aspartate-rich motif* (ASARM) aux cristaux d'hydroxyapatite en formation (Addison et al., 2010).



**Figure 9 : Hypothèse sur le mécanisme de génération de phosphate inorganique ( $\text{P}_i$ ) et de l'accumulation de calcium dans les vésicules matricielles** (Cui et al., 2016). Les vésicules matricielles (MV) permettent de concentrer les ions dans l'environnement extracellulaire et d'induire la formation

de cristaux d'hydroxyapatite. Ces propriétés sont dépendantes de la concentration de calcium et de Pi. La première étape de la génération de Pi est la production des substrats PHOSPHO1, phosphocholine et de phosphoéthanolamine, par l'action de la nSMase2 et/ou des phospholipases. Une fois libérées des précurseurs lipidiques membranaires, la phosphocholine et la phosphoéthanolamine subissent une hydrolyse par PHOSPHO1 pour générer du Pi intravésiculaire. Une accumulation de Pi supplémentaire dans la MV peut être facilitée par le transporteur de phosphate *pituitary-specific transcription factor* (PiT1). Le ratio PPi/Pi contrôle la propagation d'hydroxyapatite dans la MV. Les principaux régulateurs du ratio extracellulaire PPi / Pi sont NPP1 et TNAP. Source (Yu & Cui, 2016).

L'ostéocalcine (OCN) est une autre protéine non-collagénique très abondante dans le tissu osseux car majoritairement synthétisée par les ostéoblastes. Dans une moindre mesure, elle est également synthétisée par les chondrocytes hypertrophiques et les odontoblastes (Price, Otsuka, et al., 1976; Price, Poser, et al., 1976). En plus des fonctions endocrines exercées sur le métabolisme du glucose par sa forme active (GLU-OCN), elle possède dans sa forme inactive (GLA-OCN) des fonctions minéralisantes controversées (Figure 10).

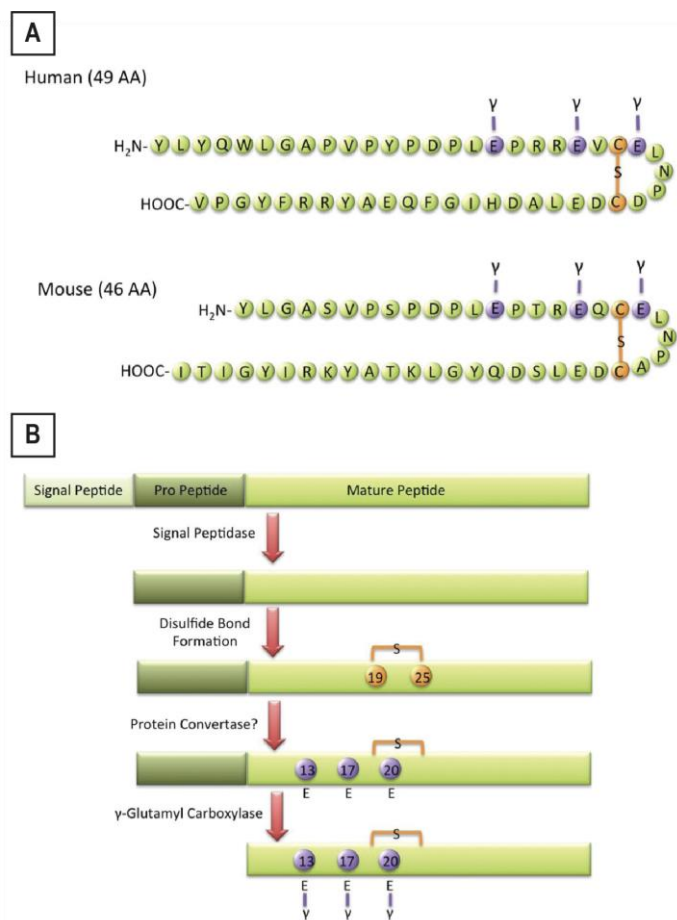


**Figure 10 : Hypothèse de boucle de régulation positive reliant le renouvellement osseux et la régulation énergétique** (Rosen & Motyl, 2010). L'insuline active le remodelage osseux (augmentation de la formation du tissu osseux par les ostéoblastes et de la résorption par les ostéoclastes). La forme inactive non-carboxylée (GLU-OCN) produite par des ostéoblastes ou libérée de la matrice osseuse par le pH acide présent dans les lacunes de résorption ostéoclastiques, entre dans la circulation sanguine afin d'agir comme une véritable hormone. L'insuline active le remodelage osseux, qui à son tour libère de l'OCN non carboxylée (GLU-OCN) de la matrice squelettique vers la circulation sanguine. L'OCN sérique va favoriser la sécrétion d'insuline et augmente la sensibilité à l'insuline des adipocytes. D'autres études ont suggéré que l'OCN stimule la production de neurotransmetteurs dans le cerveau ainsi que la production de testostérone par les testicules. Afin de modérer cette stimulation, la tyrosine phosphatase

OST-PTP codée par le gène Esp se lie au récepteur de l'insuline (IR) et réprime son activation par déphosphorylation. Le facteur de transcription TWIST2 est un suppresseur critique en aval de la différenciation des ostéoblastes. L'ostéoprotégérine (OPG) est un inhibiteur de la différenciation et de l'activation des ostéoclastes. En se liant à RANK, OPG bloque l'interaction de celui-ci avec le récepteur RANK. Sources : (Rosen & Motyl, 2010; Zoch et al., 2016).

Les résidus  $\gamma$ -carboxyglutamiques (GLA) qui caractérisent cette forme lui confère une forte affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  et les cristaux d'hydroxyapatite (Murshed et al., 2004; Zoch et al., 2016) (Figure 11). Bien que des fonctions anti et pro-minéralisantes ont à la fois été associées à cette protéine, l'hypothèse la plus probable semble tout de même se diriger vers un rôle anti-minéralisant car OCN inhibe la précipitation de sel calcique, et que la déplétion d'OCN dans des ostéoblastes chez la souris induit un phénotype d'hyperminéralisation osseuse avec une augmentation de la taille des cristaux d'hydroxyapatite (Boskey et al., 1998; Hoang et al., 2003; Zoch et al., 2016). En interagissant avec ces cristaux et OPN, OCN formerait également des ponts entre la fraction protéique et minérale du tissu osseux afin de rigidifier l'os et de mieux répartir l'énergie en cas de contrainte physique (Nikel et al., 2013; Ritter et al., 1992).

**Figure 11 : Structure et synthèse de l'ostéocalcine** (Zoch et al., 2016). **A.** La structure de l'OCN est marquée par 3 résidus  $\gamma$ -carboxyglutamiques (GLA) et un pont disulfure. La protéine humaine possède 49 acides aminés avec les résidus aux positions 17, 21, 24 et le pont disulfure reliant les résidus cystéines en positions 23 et 29. La protéine murine possède 46 acides aminés avec les résidus aux positions 13, 17, 20. **B.** L'OCN est traduite en pré-pro-peptide. Après clivage, le peptide migre dans le reticulum endoplasmique afin de former le pont disulfure et l'ajout des résidus  $\gamma$ -carboxyglutamiques. Source : (Zoch et al., 2016).



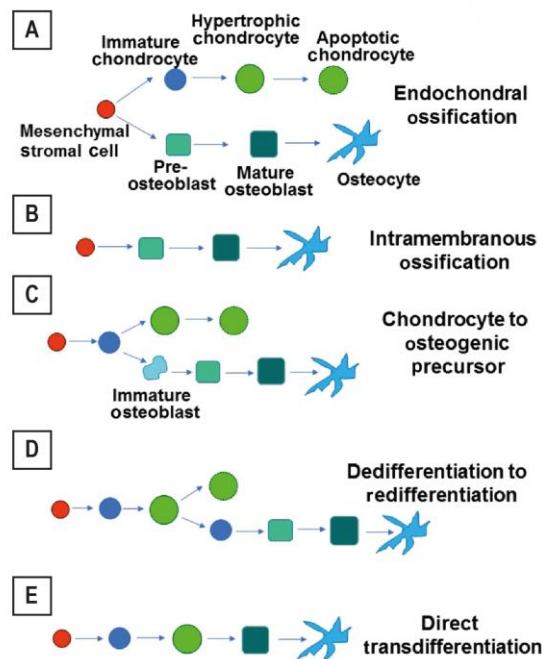
La formation du tissu osseux nécessite une grande quantité d'ions provenant de sources multiples. Le sérum sanguin en est une importante et permet un apport direct d'ions en solution qui sont utilisés par les cellules ostéogéniques qui excrètent des vésicules contenant des particules minérales. Celles-ci se retrouvent dans la matrice extracellulaire, intègrent les fibrilles de collagène de type I afin de former des cristaux intrafibrillaires ou interfibrillaires. Il existerait cependant d'autres voies de minéralisation car

des vésicules contenant des particules minérales sont présentes dans le sérum sanguin, et des particules minérales sans membrane ont été détectées dans les parois des vaisseaux sanguins (Boonrungsiman et al., 2012; Haimov et al., 2020; Mahamid et al., 2011).

#### E. Front d'ossification

Le devenir des chondrocytes hypertrophiques terminaux n'est pas encore totalement compris. Il semble unanime qu'une grande partie de ces cellules finissent par disparaître par apoptose, à la suite du manque d'oxygénation et d'apport nutritif liés à leur emmurement progressif dans le cartilage calcifié. Il a d'ailleurs été montré que les phosphatases inorganiques induisent l'apoptose chondrocytaire via la voie MAPK/JNK et l'oxyde nitrique (NO) (Zhong et al., 2011). Ce phénomène serait par ailleurs indispensable à la croissance osseuse car en dégénéralant, les chondrocytes libèrent une quantité élevée d'ions favorisant la minéralisation de la matrice extracellulaire (Magne et al., 2003). Ces cellules apoptotiques sont remplacées par des cellules stromales mésenchymateuses qui se différencient en ostéoblastes produisant du collagène de type I et des protéines spécifiques associées au tissu osseux comme la *Bone sialoprotein* (BSP), OPN, OCN, COL1A1 (Amizuka, 2012; St-Jacques et al., 1999).

Néanmoins, il semblerait qu'une partie de ces cellules échapperaient tout de même à cette dégénérescence cellulaire. En effet, des travaux ont montré que chez la souris certains chondrocytes n'entreraient pas en apoptose mais deviendraient en réalité des ostéoblastes via un phénomène de transdifférenciation (Aghajanian & Mohan, 2018; Zhou et al., 2014). Plusieurs modèles de transdifférenciation en ostéoblastes ont été proposés (Figure 8). Ce processus se produirait également en cas de fracture osseuse (Aghajanian & Mohan, 2018). Les mécanismes régulateurs sont encore mal compris, mais il semblerait que l'augmentation des facteurs BMP, WNT et les MMP soient nécessaires (Day & Beck, 2011). Certains résultats restent cependant à interpréter de manière critique car certains auteurs avancent des taux particulièrement élevés du nombre de cellules se transdifférenciant. Ces résultats semblent s'éloigner de ce que l'on observe sur les coupes histologiques, où une très grande partie des chondrocytes hypertrophiques finissent par perdre leur noyau et dégénérer... (Aghajanian & Mohan, 2018; Amizuka, 2012).



**Figure 8 : Modèles de formation osseuse** (Aghajanian & Mohan, 2018). **A.** Ossification endochondrale. Les cellules mésenchymateuses stromales se différencient en deux différentes lignées, chondrogéniques et ostéogéniques. **B.** Ossification intramembranaire. Les ostéoblastes ne nécessitent pas la formation d'une maquette cartilagineuse. Les cellules mésenchymateuses stromales se différencient directement en cellules ostéogéniques. **C.** Chondrocyte en précurseur ostéogénique. Des chondrocytes immatures se différencient en précurseurs ostéogéniques qui se différencient en pré-ostéoblastes et ostéoblastes. **D.** Dédifférenciation et redifférenciation. Dédifférenciation des chondrocytes hypertrophiques en chondrocytes immatures et redifférenciation en cellules ostéogéniques. **E.** Transdifférenciation directe. Des chondrocytes hypertrophiques se différencient directement en ostéoblastes. Adapté de (Aghajanian & Mohan, 2018).

Le VEGFA synthétisé par les chondrocytes hypertrophiques est un facteur angiogénique très important qui favorise l'invasion de la maquette cartilagineuse par des vaisseaux sanguins (Maes, Kobayashi, et al., 2010). La délétion du gène codant pour le VEGFA chez la souris induit un retard de la vascularisation des centres d'ossification, un retard de l'érosion du cartilage hypertrophique, favorise l'apoptose des chondrocytes (Haigh et al., 2000; Zelzer et al., 2002). Ce facteur intervient également dans la différenciation des ostéoblastes (Duan et al., 2015). A l'inverse, la surexpression de VEGFA dans les ostéochondroprogéniteurs induit un phénomène d'augmentation de masse osseuse. Son action fait intervenir le récepteur VEGFR2, IHH, la bêta-caténine et NOTCH2 (Maes, Goossens, et al., 2010).

La colonisation de la maquette par des vaisseaux sanguins va littéralement déclencher la différenciation du cartilage en tissu osseux grâce à un apport de nutriments, de précurseurs souches de la moëlle osseuse et des cellules ostéo-progénitrices comme les ostéoblastes et ostéoclastes (Figure 3E) (revue dans (Dao et al., 2012; Walzer et al., 2014)). Le processus de vascularisation débute par la formation de la virole osseuse péri-chondrale de Ranvier représentant le point d'entrée central de la vascularisation de l'os en formation. La vascularisation se produit d'abord au centre de l'os au niveau du centre primaire d'ossification, et au niveau des épiphyses mais avec ici un décalage temporel vu que les centres d'ossification épiphysaires se forment plus tard que le centre primaire [revu dans (Hallett et al., 2019)]. Les vaisseaux sanguins et les cellules souches mésenchymateuses forment des bourgeons conjonctivo-vasculaires qui s'enfoncent dans le cartilage. (Lewinson & Silbermann, 1992; Maes, Kobayashi, et al., 2010; Streeten & Brandi, 1990). La diaphyse et la métaphyse présentent deux types de populations différentes de cellules endothéliales, ayant chacune leur propre fonction et morphologie. Les cellules de

type L sont plus abondantes dans la diaphyse alors que les cellules de types H occupent principalement la métaphyse car celle-ci sont impliquées dans l'ostéogenèse : elles sont caractérisées par un bourgeon à une extrémité qui, avec leur forme étroite et agencée en colonne, leur permet d'envahir plus facilement le cartilage (Haimov et al., 2020; Ramasamy et al., 2016). Des études ont montré qu'une angiogenèse inappropriée peut conduire à des anomalies développementales comme de la dysmorphie faciale et de l'ostéonécrose (Chan et al., 2011; Percival & Richtsmeier, 2013).

Des ostéoclastes (chondroclastes) amenés par les bourgeons conjonctivo-vasculaires phagocytent les débris des chondrocytes dégénérés, effondrent les septa transverses et une partie des septa longitudinaux, créant des lacunes occupées par du tissu conjonctif jeune (Lewinson & Silbermann, 1992). Certains septa longitudinaux de cartilage calcifié échappent néanmoins à leur destruction et une partie de la matrice cartilagineuse minéralisée subsiste sous forme de piliers servant de base pour le dépôt de tissu osseux. Par conséquent, certaines travées osseuses sont dites endochondrales car construites sur base d'une âme cartilagineuse (Lewinson & Silbermann, 1992; Maes, Kobayashi, et al., 2010; Streeten & Brandi, 1990). Des ostéoblastes immatures y déposent du tissu ostéoïde riche en collagène de type I sur la MEC déjà riche en collagène de type X pour former la zone spongieuse primaire qui préfigure le futur os trabéculaire. Ils libèrent des protéines osseuses telle que l'ostéopontine, l'ostéonectine, la sialoprotéine et des phosphoprotéines qui possèdent des sites de liaison au calcium (Marie, 2001). Enfin, ils synthétisent des phosphatases alcalines qui dégradent les pyrophosphatases inorganiques inhibiteurs de minéralisation présents dans la MEC (Kronenberg, 2003; Streeten & Brandi, 1990). Le cartilage calcifié résiduel et le tissu osseux primaire sont dans un second temps remplacés par du tissu osseux définitif synthétisé par des ostéoblastes matures (Maes, Kobayashi, et al., 2010; Sasaki et al., 1996). La différenciation ostéoblastique est coordonnée par de nombreuses protéines, dont celles de la famille des BMP et des facteurs de transcription clés comme TGF- $\beta$  et RUNX2 (Goldring, 2015).

#### **1.3.4 Fin de la croissance**

Une fois la matrice osseuse synthétisée et minéralisée, une partie des ostéoblastes subissent un phénomène d'apoptose. Les autres cellules s'aplatissent et se retrouvent incluent dans la matrice extracellulaire, dans des logettes (ostéoplastes) et devenant des ostéocytes reliés par un réseau d'extension cytoplasmiques dans des canalicules. Ces cellules sont impliquées dans la régulation de la matrice osseuse en contrôlant le dépôt de tissu osseux et sa résorption via l'action des ostéoclastes.

Le squelette est alors constamment renouvelé par un processus portant le nom de remodelage osseux. Ce phénomène adapte la conformation des os en fonction des contraintes physiques qu'ils subissent dans l'optique de fournir le maximum de résistance avec un minimum de matière (revu dans (Goldring, 2015). C'est d'ailleurs pour cela que les os longs sont creux en leur centre. Il permet également de réparer les microfissures et réguler la libération de calcium et phosphate (Raggatt & Partridge, 2010). Ce processus est essentiellement conduit par deux types cellulaires aux rôles antagonistes : les ostéoblastes qui



synthétisent le tissu osseux, et les ostéoclastes qui ont pour fonction de le résorber. Ces types cellulaires sont majoritairement contrôlés par des ostéocytes qui sont emmurés dans la matrice osseuse. Le contrôle des ostéoclastes par les ostéocytes fait intervenir la synthèse de RANKL et d'OPG (Savostin-Asling & Asling, 1973; Tatsumi et al., 2007). Ils interviennent dans la régulation du remodelage osseux, de l'homéostasie du calcium et du phosphate, et agiraient comme senseurs des contraintes mécaniques (Maes & Kronenberg, 2012; Raggatt & Partridge, 2010).

Au fur et à mesure de la croissance, le cartilage centro-diaphysaire disparaît pour laisser place à une cavité médullaire parcourue de travées osseuses et progressivement colonisée par la moëlle hématopoïétique.

Durant la période de croissance post-natale, la croissance en longueur des os longs est sous la dépendance de facteurs hormonaux : l'IGF-1 via l'hormone de croissance GH et notamment les stéroïdes sexuels (androgènes et oestrogènes) (Irie et al., 2005; Kawai & Rosen, 2012). L'augmentation de la production d'hormones sexuelles au terme de la puberté accélère la sénescence cellulaire et induit un effet apoptotique sur les chondrocytes prolifératifs (Weise et al., 2001). Cet effet est notamment visible chez des patients qui ont un défaut d'expression ou une résistance aux oestrogènes, et où la plaque de croissance ne se ferme pas correctement (Smith et al., 1994). La plaque de croissance se réduit au fur et à mesure que la croissance avance, « grignotée » par le front d'ossification, pour finir par disparaître lorsque lorsqu'elle aura été entièrement remplacée par du tissu osseux. Cette étape est appelée la soudure (ou fermeture) de la plaque de croissance (Egawa et al., 2014; Toppets et al., 2004). On peut d'ailleurs évaluer facilement le niveau de soudure des plaques de croissance à la radiographie. L'os adulte est alors composé d'os cortical ou compact et d'os trabéculaire ou spongieux. L'os cortical constituant la paroi compacte de la diaphyse possède une porosité moins élevée (5 à 30%) que l'os trabéculaire (30 à 90%) situé dans les régions métaphysaires et diaphysaires des os (Toppets et al., 2004; Young & Kobluk, 1995).



## 2 L'OPSISMODYSPLASIE

### 2.1 Description

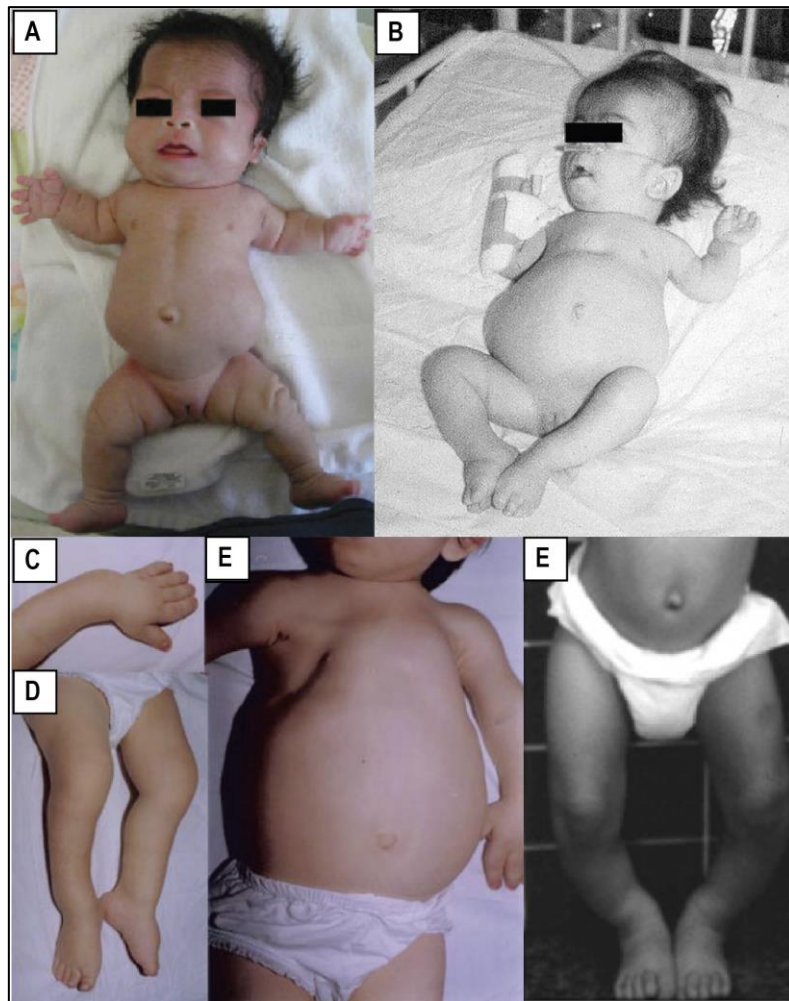
L'opsismodysplasie (OPS) (OMIM 258480) est une dysplasie squelettique humaine rare caractérisée par des anomalies de la plaque de croissance et une maturation osseuse retardée. Les patients atteints de cette maladie présentent un nanisme congénital et une dysmorphie faciale (Figure 12). Vu l'hétérogénéité de la maladie et son extrême rareté, nous allons passer en revue dans ce chapitre l'ensemble des cas officiellement répertoriés dans la littérature.

Cette chondrodysplasie aurait été mise en évidence pour la première fois en 1977 par Zonana (Zonana et al., 1977). Ce n'est qu'en 1984 que le nom officiel « opsismodysplasie » (venant du grec *opsismos* signifiant « retardé ») lui fut attribué par Maroteaux, sans que l'origine ne soit identifiée. A ce moment, seuls 5 cas sont répertoriés. Sur l'un d'eux, l'analyse du cartilage de croissance permet d'identifier une zone hypertrophique étendue contenant des septa de tissu conjonctif épais, une calcification primaire irrégulière et une invasion vasculaire. Du collagène de type I est également détecté dans cette zone hypertrophique par immunohistochimie (Maroteaux et al., 1982, 1984).

En 1994 et 1995, 2 autres cas hétérogènes sont identifiés à la suite de consanguinité. L'un d'eux ne présente qu'une anomalie de la commissure de la bouche (macrostomie). L'autre cas, âgé de 16 mois, est sévèrement atteint avec une macrocéphalie, une absence de centre d'ossification dans les carpes et tarses, des fémurs distaux et des tibia proximaux (Beemer & Kozlowski, 1994; Santos & Saraiva, 1995).

En 1997, un individu âgé de 6 ans diagnostiqué OPS présente également une dilation ventriculaire secondaire à une atrophie cérébrale. Il présente des symptômes (reflux vésico-urétéral, une hydronéphrose et de la tendance à la pseudo-obstruction intestinale) probablement liés à une hypotonie musculaire d'origine neuromusculaire (Zeman et al., 1997).

En 1999, le groupe de Tyler identifie 5 cas morts avant, ou peu de temps après la naissance. Ils étaient tous le fruit de consanguinité au sein d'une même famille. L'un d'eux présente en plus une hypoplasie trachéo-pulmonaire, du thymus, du foie et une hypoplasie des artères rénales. L'analyse immunohistochimique de la zone hypertrophique révèle une concentration élevée en collagène de type I chez 4 des 5 individus (Tyler et al., 1999).



**Figure 12 : Phénotype clinique présenté par les patients opsismodysplasiques. A-B.** Deux patients à la naissance présentant une micromélie rhizomélique, macrocéphalie, front saillant, pont nasal déprimé, narines antéversées, implantation basses des oreilles, thorax étroit et abdomen distendu (Iida et al., 2013a; Ramos et al., 2006). **C-D.** Pieds et mains très courts d'un patient âgé de 7 ans, (**E.**) présentant également un thorax étroit particulièrement visible ainsi qu'une distension abdominale (Li et al., 2014). **F.** Membres inférieurs avec une déformation en valgus chez un patient âgé de 4 ans (Huber et al., 2013).

En 2003, l'équipe de Cormier-Daire décrit 12 nouveaux cas (issus de consanguinité dans 9 familles) qui présentent tous une macrocéphalie, un retard d'ossification épiphysaire, une platyspondylie, des métaphyses en formes de ventouses et de très courts métacarpes et phalanges. Pour 8 cas, l'échographie a mis en évidence un raccourcissement des os longs. 6 cas sont officiellement diagnostiqués *in utero* par échographie, provoquant l'arrêt de la grossesse. Pour les 6 autres cas, le diagnostic fut posé après la naissance. Tous présentaient une circonférence crânienne normale à la naissance, et la moitié d'entre eux possédaient une taille normale. Le plus jeune décéda à 3 mois de défaillance respiratoire, les 5 autres ont survécu entre 28 mois et 15 ans. L'analyse radiographique des différents individus a mis en évidence une ossification épiphysaire extrêmement retardée, des métacarpes courts et des irrégularités métaphysaires aux niveaux des genoux. L'analyse histologique des os fœtaux a mis en évidence de

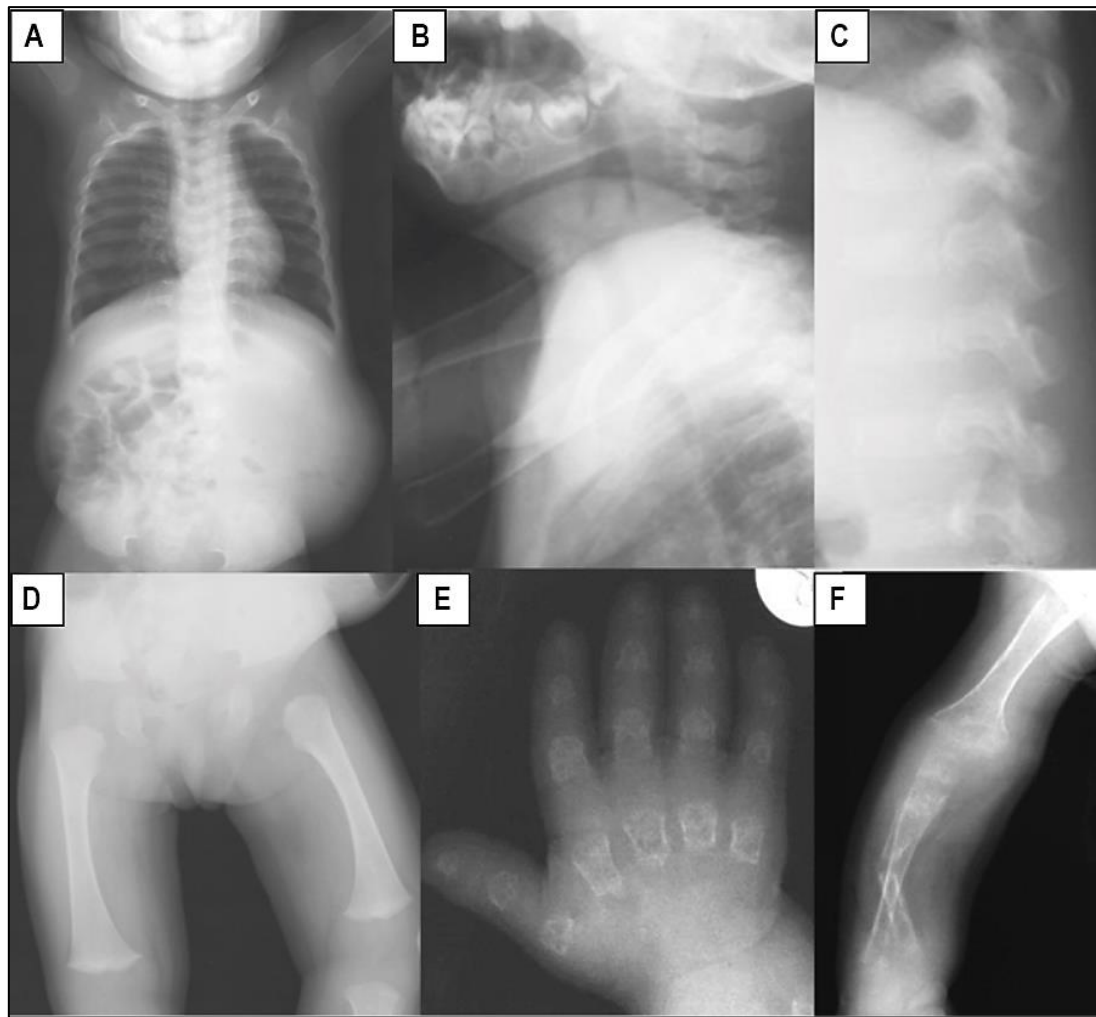
nombreux canaux vasculaires élargis, une augmentation de la densité en chondrocytes dans la zone germinale avec une organisation en clusters de cellules, une zone proliférative désorganisée avec une absence d'arrangement en colonne des chondrocytes (Cormier-Daire et al., 2003).

En 2005, un nouveau-né diagnostiqué à la naissance présentait une hydrocéphalie (Ramos et al., 2006). Pour la première fois, l'opsismodysplasie est associée à une hypophosphatémie chez un individu âgé de 7 ans (Bülbül et al., 2005).

En 2006, un groupe de chercheurs réalise des tests sur deux enfants de 3 ans opsismodysplasiques présentant également de l'hypophosphatémie. Ceux-ci présentèrent un rachitisme, un taux de réabsorption tubulaire diminué et, chez l'un des deux patients, un taux de *Fibroblast growth factor 23* (FGF23) sérique augmenté. La minéralisation osseuse s'est améliorée lors de complémentation orale en phosphate et en calcitriol sans corriger l'hypophosphatémie sous-jacente (Zeger et al., 2007).

En 2009, des malformations cranio-cervicales sont pour la première fois identifiées chez deux individus âgés de 7 et 11 ans issus de la même fratrie (Al Kaissi et al., 2009).

En 2013, plusieurs groupes de généticiens se penchent sur l'OPS. Le groupe de Below a analysé par séquençage la récurrence de mutations parmi 12 individus atteints issus de 10 familles différentes. Ils constatent que des mutations affectant le gène *INPPL1* (codant pour la protéine SHIP2) sont présentes chez près de 60% des cas analysés : 9 mutations différentes sont identifiées provoquant principalement l'apparition prématurée d'un codon stop. Sur les 10 individus, 3 ont été identifiés comme hétérozygotes (Below et al., 2013). Dans un autre groupe de 16 individus issus de 10 familles, le groupe de Huber a quant à lui identifié 12 mutations différentes pour le même gène *INPPL1*. Ces mutations sont responsables dans la moitié des cas de l'apparition d'un codon stop. L'analyse histologique de la plaque de croissance du fémur de 4 individus (dont 3 individus issus d'une même famille) a mis en évidence une désorganisation de la plaque de croissance, avec une absence d'arrangement en colonne des chondrocytes prolifératifs, une réduction de la taille de la zone hypertrophique et un nombre réduit de cellules hypertrophiques (Huber et al., 2013). Enfin, un autre groupe japonais a identifié une nouvelle mutation du gène *INPPL1* non encore décrite chez un patient âgé de 9 ans (parmi un groupe de deux familles analysées). Le groupe de chercheurs soulève que l'autre individu analysé (sans mutation du gène *INPPL1*, mais diagnostiqué comme opsismodysplasique) présente également des signes cliniques non caractéristiques : une fragmentation des épiphyses et la conisation de la partie distale des fémurs (Iida et al., 2013a).



**Figure 13 : Radiographies de deux patient atteints d’OPS âgés de 21 mois (A-D) et 7 ans (E-F)** (Li et al., 2014). Ces radiographies reprennent les principales caractéristiques de l’OPS comme le retard de croissance osseuse, les os longs raccourcis, les anomalies métaphysaires et vertébrales. **A.** Vue antéro-postérieure du thorax illustrant le thorax étroit et un pelvis rétréci. **B-C.** Vues latérales du cou et de la colonne vertébrale permettant de visualiser la platyspondylie et l’hypominéralisation vertébrale. **D.** Vue antéro-postérieure du fémur montrant le retard de croissance sévère épiphysaire de la partie proximale des fémurs, et un élargissement métaphysaire de leur région distale. **E.** Vue antéro-postérieure des métacarpes et phalanges anormalement courts et irréguliers avec une ossification carpale réduite. **F.** Vue antéro-postérieure de l’avant-bras illustrant une hypominéralisation osseuse. Adapté de (Li et al., 2014)

En 2015, une même mutation du gène *INPPL1* (c.2415+1G>A ) est identifiée à l’état hétérozygote chez un individu viable atteint d’OPS et à l’état homozygote chez un autre individu présentant les caractéristiques de la dysplasie Schneckenbecken (Below et al., 2013; Lee et al., 2015). Cette spondylodysplasie létale durant la période prénatale est caractérisée par une platyspondylie, un thorax étroit, des os longs courts en forme d’altère, une ossification précoce du tarse et surtout par la conformation en forme d’escargot (*schneckenbecken* en allemand) de l’os iliaque hypoplasique à la radiographie (Lee et al., 2015).

En 2016, 2 nouveaux fœtus morts-nés sévèrement atteints sont diagnostiqués. Ils présentent des membres courts, des métaphyses évasées, les fémurs, tibias, et radius arqués, une ossification irrégulière des pieds et mains et une platyspondylie. L'un des deux a présenté également une ventriculomégalie cérébrale accompagné d'une hydropisie. Le séquençage complet du génome des fœtus a mis en évidence deux mutations c.(2327-1G>C);(1150\_1151delGA) du gène *INPPL1*, prédites pour la formation d'un codon stop et la création d'un ARNm non-sens. L'analyse protéique confirma l'absence de protéine SHIP2 (Feist et al., 2016).

## 2.2 Signes cliniques, radiologiques et histologiques

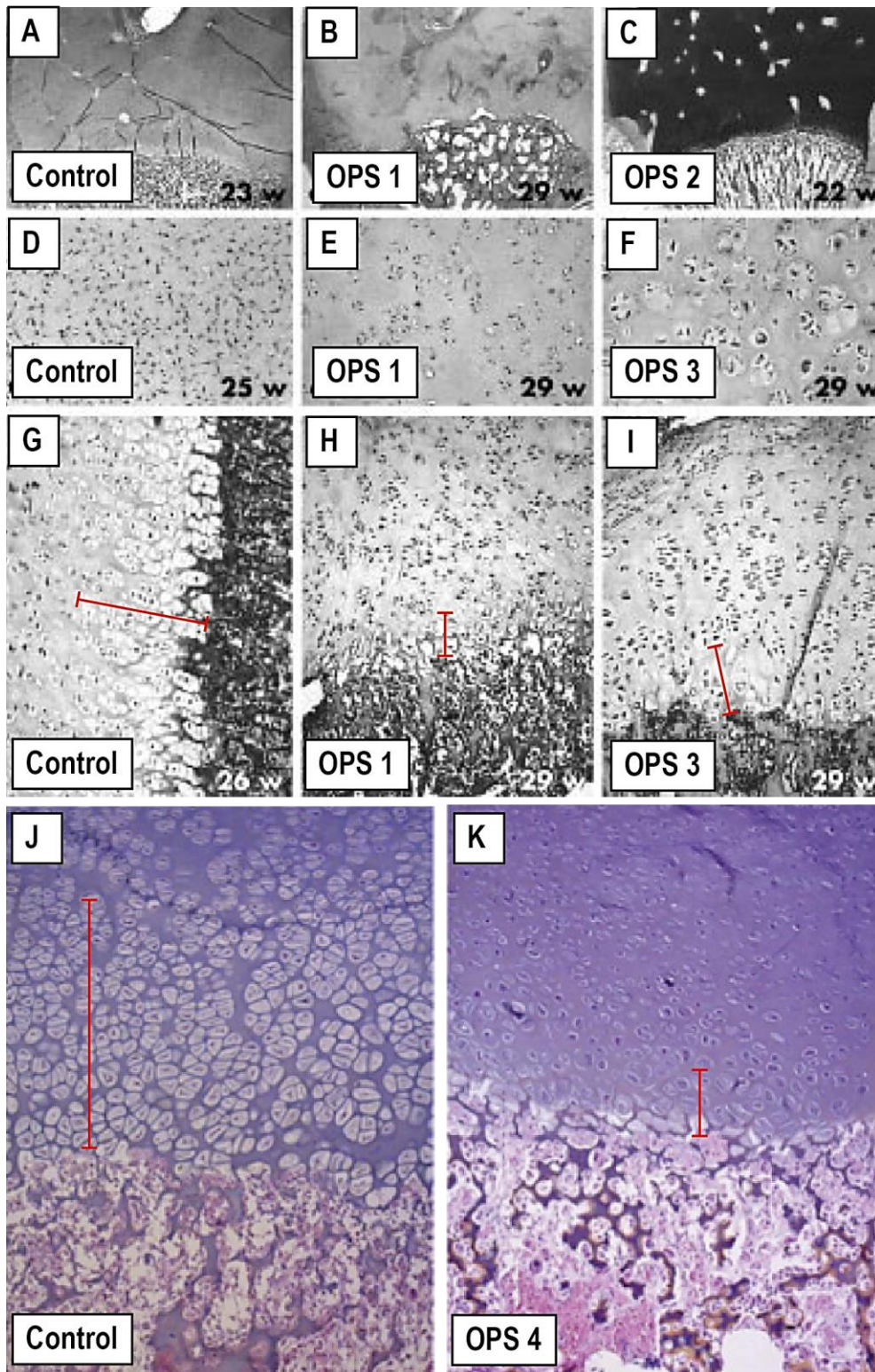
L'hétérogénéité ne facilite pas l'identification précise des caractéristiques propres de cette maladie. Néanmoins, certains éléments semblent récurrents :

Les patients atteints d'OPS présentent un nanisme congénital rhizomélisque (membres raccourcis) à croissance lente, des fontanelles larges, une macrocéphalie avec une dysmorphie faciale typique : crête frontale proéminente, pont nasal déprimé, petit nez antéversé avec un long philtrum (Figure 12). L'issue de cette maladie est très variable. En effet, sur près de 31 cas répertoriés, la mortalité des individus s'est étalée de la période foetale jusqu'à l'âge adulte. La mortalité postnatale survenant notamment à la suite de surinfections respiratoires probablement favorisée par une conformation anatomique défavorable (thorax étroit, atrophie du tractus respiratoire). Certains individus sont par ailleurs toujours en vie et âgés de près d'une trentaine d'année (Fradet & Fitzgerald, 2017). Avec aussi peu de cas décrits, l'incidence de la maladie est inférieure à 1/1.000.000.

L'analyse radiographique permet la mise en évidence des anomalies suivantes : des os longs raccourcis, une minéralisation épiphysaire retardée, des métaphyses en formes de ventouses, des phalanges et métacarpes raccourcis, une platyspondylie sévère, un thorax étroit (Fradet & Fitzgerald, 2017) (Figure 13).

Jusqu'à présent, les analyses histologiques ont été peu nombreuses et parfois contradictoires mais elles ont permis de mettre en évidence des anomalies affectant l'ossification endochondrale de la plaque de croissance (Figure 14). Dans la zone germinale, les chondrocytes sont plus nombreux et apparaissent désorganisés. Au sein de la zone de proliférative, on observe une quasi-absence d'organisation en colonne des chondrocytes prolifératifs. Selon une source plus ancienne, la zone hypertrophique a été observée comme étendue mais ces résultats ont été obtenus uniquement auprès de deux individus morts durant la grossesse ou mort-nés issus d'une même famille (Tyler et al., 1999). Des analyses plus récentes et mieux détaillées décrivent que cette zone est réduite en taille et présente un nombre significativement réduit de chondrocytes hypertrophiques. Enfin, les travées osseuses sont décrites comme épaissies, raccourcies et irrégulières (Cormier-Daire et al., 2003; Huber et al., 2013; Tyler et al., 1999).

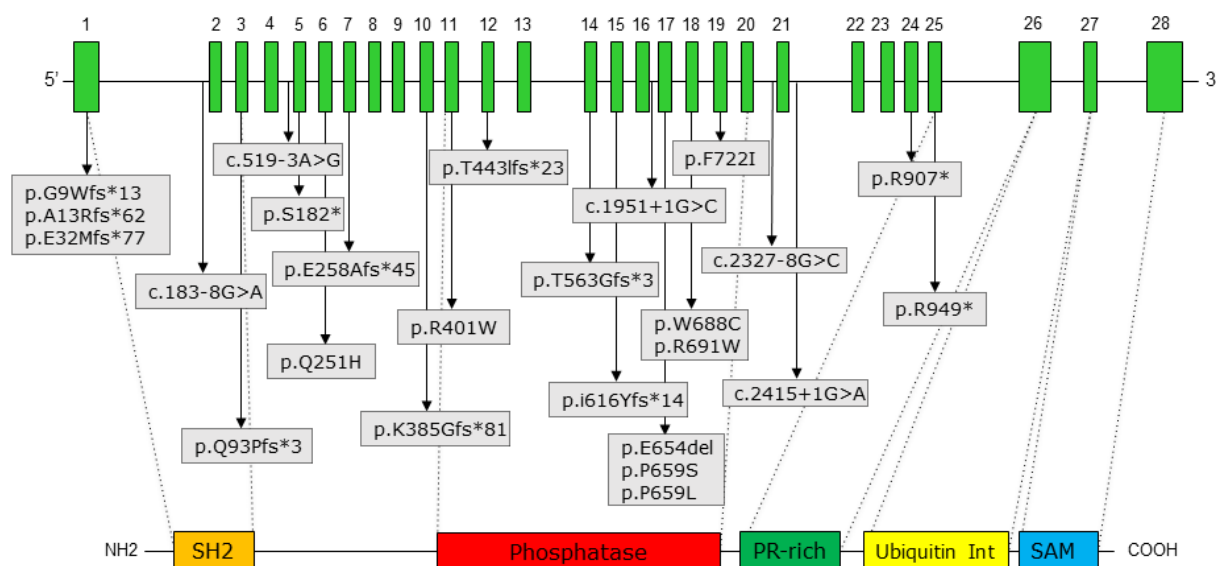




**Figure 14 : Anomalies histologiques associées à l'OPS.** A-C. Section frontale de la tête fémorale de fœtus contrôles (Control) avec 4 cas d'OPS (OPS 1-4). A noter la présence de trabécules osseuses primaires épaissies et des canaux vasculaires élargis. D-F. Agrandissement de la zone germinale de l'épiphyse proximale du fémur. A noter la formation de clusters de cellules et de chondrocytes « ballonnés ». G-K. Plaque de croissance de la tête fémorale : quasi-absence de chondrocytes hypertrophiques avec une forte diminution de la taille de la zone hypertrophique (tailles symbolisées par les traits rouges). Figures adaptées de (Cormier-Daire et al., 2003; Huber et al., 2013).

## 2.3 Etiologie

Les différents cas répertoriés nous indiquent que la récurrence de la maladie dans la fratrie ainsi que la consanguinité fréquente suggèrent un mode de transmission récessif. En effet, tous les patients répertoriés ont soit des mutations du gène *INPPL1* à l'état homozygote, soit des mutations à l'état d'hétérozygotie composite (deux allèles différents mutés, l'un venant de la mère, l'autre du père). Cela suggère que SHIP2 a besoin d'être totalement inactivé pour avoir une pénétrance complète du phénotype. Aucun des parents des individus affectés ne présentent des caractéristiques de l'OPS, suggérant également qu'un niveau de 50% de protéine sauvage de SHIP2 suffit à protéger des effets de l'allèle mutant (Fradet & Fitzgerald, 2017). Avant que les travaux de Hubert et Below montrant que de nombreux patients OPS présentent des mutations du gène *INPPL1* (codant pour SHIP2) ne soient publiés, aucune hypothèse ne fut sérieusement envisagée quant à l'origine de la maladie (Below et al., 2013; Huber et al., 2013). A noter que la plupart des cas diagnostiqués OPS ont d'abord été posés d'un point de vue clinique, ce qui pourrait expliquer pourquoi seuls 60% des patients présentent des mutations de *INPPL1*. Les autres étant peut-être atteints d'une autre maladie proche mais à l'étiologie différente. Actuellement, il semble évident que la 5-phosphatase SHIP2 joue un rôle central dans la maladie car au total 25 mutations ont été identifiées dans 20 familles différentes (Figures 15-17, Tableau 1). Par conséquent et sans que le mécanisme exact ne soit encore identifié, les mutations affectant *INPPL1* sont identifiées comme à l'origine de l'OPS (Fradet & Fitzgerald, 2017).

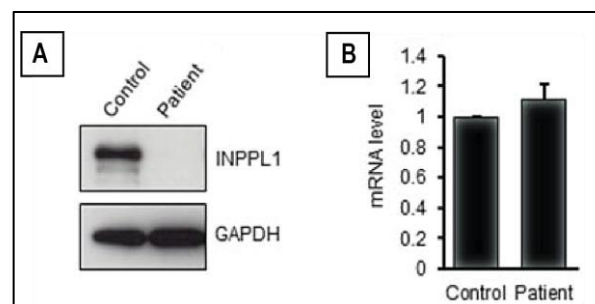


**Figure 15 : Structure génétique du gène *INPPL1* et localisation des mutations impliquées dans l'OPS (Fradet & Fitzgerald, 2017).** La structure simplifiée du gène *INPPL1* est représentée avec ses exons (barres vertes verticales). La protéine SHIP2 est représentée en bas avec ses principaux domaines. Les différentes mutations sont représentées dans des cases grises. Adapté de (Fradet & Fitzgerald, 2017).

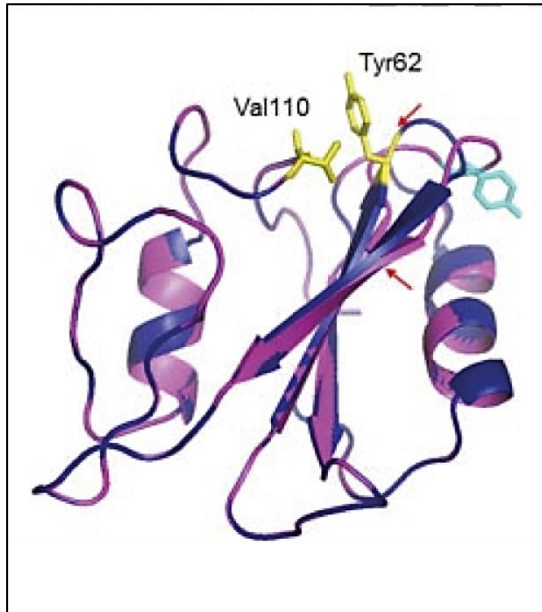
Mutation	Status	Nucleotide	AA change	Location	Domain	Consequence	N	Recurrence	Consanguinity	Outcome
Frameshift	He	c.24-39 del	p.Gly9Trp	Exon 1	-	Stop codon	2	1 family	No	Alive
Missense		c.753 G>C	p.Gln251His	Exon 6	-	-				
Frameshift	He	c.35dup	p.Ala13Arg	Exon 1	-	Stop codon	1	1 family	No	Death (newborn)
Frameshift		c.1687-1691 de	l p.Thr563Gly	Exon 14	Catalytic	Stop codon				
Frameshift	Ho	c.94-121 del	p.Glu32Met	Exon 1	SH2	Stop codon	3	2 families	Yes	Death (stillborn; newborns)
Splice site	Ho	c.183-8G>A		Intron 1		New acceptor site, in frame	1	1 family	Yes	Alive
Frameshift	He	c.276-280 del	p.Gln93Pro	Exon 3	SH2	Stop codon	1	1 family	No	Alive
Missense		c.1975 C>T	p.Pro659Ser	Exon 17	Catalytic	-				
Splice site	Ho	c.519-3A>G		Intron 4		New acceptor site, stop codon	1	1 family	Yes	Alive
Nonsense	Ho	c.545 C>A	p.Ser182	Exon 5	-	Stop codon	1	1 family	Yes	Alive
Frameshift	Ho	c.768-769 del	p.Glu258Ala	Exon 7	-	Stop codon	1	1 family	No	Alive
Frameshift	He	c.768-769 del	p.Glu258Ala	Exon 7	-	Stop codon	1	1 family	No	Alive
Splice site		2415+1G>A		Intron 21	-	Suppression, donor site, stop, codon				
Frameshift	He	c.1150-1151 de	l p.Lys385Gly	Exon 10	-	Stop codon	2	1 family	No	Termination of pregnancy (17 weeks); death (stillborn)
Splice site		c.2327-1G>C		Intron 20		Skipping exon 21, stop codon				
Missense	He	c.1201 C>T	p.Arg401Trp	Exon 11	Catalytic	-	2	1 family	No	Alive; termination of pregnancy
Missense		c.2164 T>A	p.Phe722Ile	Exon 19	Catalytic	-				
Frameshift	He	c.1328 delins T	A p.Thr443Ile	Exon 12	Catalytic	Stop codon	2	1 family	No	Termination of pregnancy (15 weeks)
Missense		c.2064 G>T	p.Trp688Cys	Exon 18	Catalytic	-				
Frameshift	Ho	c.1845 dupT	p.Ile616Tyr	Exon 15	Catalytic	Stop codon	3	1 family	Yes	Termination of pregnancy (14, 15 and 29 weeks)
Splice site	Ho	c.1951+1G>C		Intron 16		Suppression donor site, stop codon	1	1 family	Yes	Alive
In frame	Ho	c.1960-1962 de	l p.del Glu	Exon 17	Catalytic	-	1	1 family	No	Alive
Missense	Ho	c.1976 C>T	p.Pro659Leu	Exon 17	Catalytic	-	4	2 families	Yes/?	Alive
Missense	Ho	c.2071 C>T	p.Arg691Trp	Exon 18	Catalytic	-	1	1 family	Yes	Termination of pregnancy
Nonsense	Ho	c.2719C>T	p.Arg907	Exon 24	-	Stop codon	1	1 family	Yes	Alive
Nonsense	Ho	c.2845 C>T	p.Arg949	Exon 25	SH3	Stop codon	2	1 family	Yes	Termination of pregnancy; death (15 months)

**Tableau 1. Mutations affectant le gène *INPPL1* et devenir des patients opsismodysplasiques** (Fradet & Fitzgerald, 2017). Au total, 25 mutations différentes affectant le gène *INPPL1* ont été identifiées parmi 20 familles différentes (3 mutations *non-sens*, 1 mutation *in-frame*, 7 mutations *missense*, 9 mutations *frameshift* et 5 mutations *splice-site*). Les mutations *nonsense* et *frameshift* induisent la formation prématurée d'un codon stop et sont prédites pour induire la formation d'une protéine tronquée de son domaine catalytique, et aussi pour certaines du domaine riche en proline ou du domaine *sterile alpha-motif* (SAM). 6 des 7 mutations *missense* sont localisées dans le domaine catalytique, ce qui à priori inactiverait également la fonction phosphatase de SHIP2. En conclusion, la majorité de ces mutations induit une absence d'expression de protéine SHIP2 (17/25). Parmi les individus ayant survécus et répertoriés dans la littérature, le plus vieux est âgé d'une vingtaine d'année. Il possède une mutation frameshift localisée en dehors du domaine catalytique (p.Gln251His). Abréviations : AA, acide aminé; He, hétérozygote; Ho, homozygote; N, nombre de patients atteints. Adapté de (Fradet & Fitzgerald, 2017).

**Figure 16 : Analyse de l'expression transcriptionnelle et protéique chez un patient atteint d'opsismodysplasie** (Li et al., 2014). **A.** Western blot de la protéine SHIP2 et **B.** détection de l'ARNm de SHIP2 par PCR quantitative réalisés sur des cellules lymphoblastoïdes issues d'un patient contrôle et d'un patient atteint d'OPS (c.183-8G>A). Adapté de (Li et al., 2014).







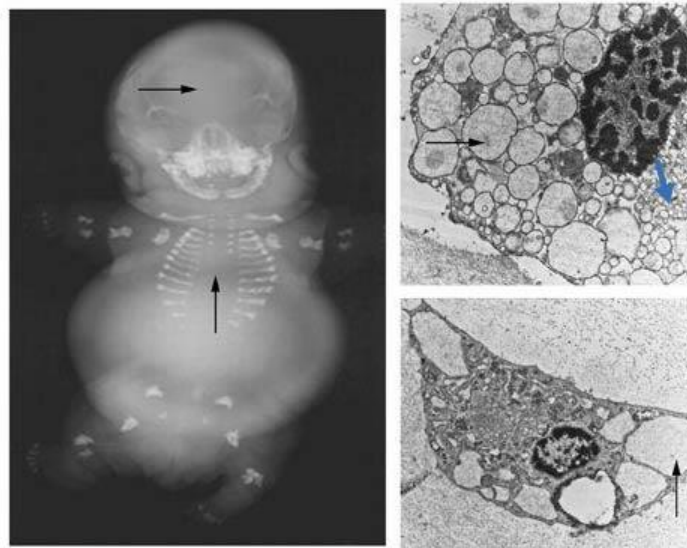
**Figure 17 : Modélisation de la structure 3D du domaine SH2 d'une protéine mutante et sauvage de SHIP2** (Li et al., 2014). Superposition des structures 3D des domaines SH2 d'une protéine sauvage (bleue) et mutante (magenta) (c.183-8G>A). L'insertion de cette mutation est prédite pour altérer une région en boucle qui connecte normalement deux feuillets B (flèches rouges). Elle est aussi prédite pour induire l'exposition du résidu hydrophobe très conservé Tyr62 à la surface de la protéine, ce qui pourrait rompre l'interaction entre Tyr62 et Val110. Tyr62 et Val110 de la protéine sauvage (jaune) et Tyr62 de la protéine mutée (cyan). La perte ou l'affaiblissement de cette interaction pourrait augmenter la flexibilité de la boucle, mener à une instabilité de la structure protéique, et se traduire par une expression protéique diminuée de SHIP2. Adapté de (Li et al., 2014)

## 2.4 Classification

Afin de faciliter sa vision et sa compréhension, l'homme a pris l'habitude de catégoriser les maladies qu'il découvre. L'OPS ne déroge pas à cette règle et a été intégrée dans le cercle très fermé du groupe des *dysplasies spondylodysplasiques sévères* faisant partie d'une classification regroupant 461 troubles génétiques squelettiques répartis dans 42 groupes en fonction de leurs signes cliniques, radiologiques et/ou du phénotype moléculaire (Huber et al., 2013; Mortier et al., 2019). En plus de l'OPS, ce groupe comprend 5 autres dysplasies, toutes à transmission récessive et de sévérité variable :

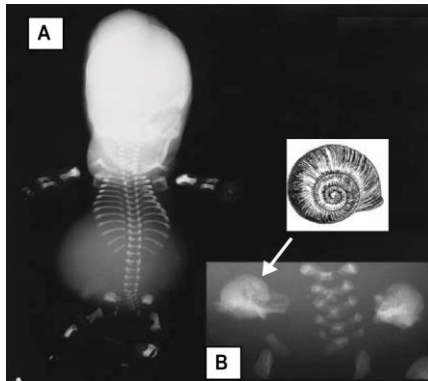
- **L'achondroplasie de type 1A (ACG1A)** (OMIM 200600) provoquée par un déficit en protéine associée aux microtubules-Golgi 210 (GMAP-210), induite par la mutation du gène récepteur de l'hormone thyroïdienne interacteur 11 (TRIP11). GMAP-210 est impliqué dans le trafic membranaire entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Il a été montré chez la souris que son déficit induit une altération de l'architecture de l'appareil de Golgi dans de nombreux tissus, dont le tissu cartilagineux. En l'absence de GMAP-210, les chondrocytes présentent un gonflement cytoplasmique et un « stress » du reticulum endoplasmique, une différenciation cellulaire anormale et une mort cellulaire accrue. Les cellules présentent par ailleurs une accumulation cytoplasmique de perlécane, une protéine de la MEC (Smits et al., 2010). Cette maladie létale se traduit chez l'homme par un retard de croissance fœtale caractérisées par une absence de corps vertébraux et d'ossification du crâne, une micromélie avec des os longs courts et déformés. Au niveau histologique, la plaque de croissance présente une absence d'organisation en colonne des chondrocytes de la zone proliférative et une réduction de l'expression de COL10A1.

Chez la souris *TRIP11<sup>-/-</sup>*, il a également été décrit une réduction de la taille des chondrocytes hypertrophiques (Figure 18) (Bird et al., 2018; Grigelioniene et al., 2013; Smits et al., 2010).



**Figure 18: Achondroplasie de type 1A** (Smits et al., 2010). Radiographie d'un fœtus humain de 27 semaines atteint d'achondroplasie de type 1A révélant des membres raccourcis, une absence de minéralisation du crâne et des corps vertébraux (flèches noires). Les images prises par microscopie électronique montrent des chondrocytes isolés de deux fœtus différents atteints d'achondroplasie de type 1A. Les cellules présentent un gonflement du RE (flèches noires) et de l'appareil de Golgi (flèche bleue). Adapté de (Smits et al., 2010)

- **La dysplasie schneckenbecken** (OMIM 610804) a été associée à des mutations perte de fonction affectant le gène *Solute carrier family 35 member D1* (SLC35D1). Ce dernier code pour un transporteur (SLC35D1) présent dans le reticulum endoplasmique et ayant pour rôle de transporter l'uridine diphosphate-acide glucuronique (UDP-acide glucuronique) et l'UDP-N-acétylgalactosamine du cytoplasme vers la lumière du reticulum endoplasmique. Il joue par conséquent un rôle essentiel dans la synthèse de la chondroïtine sulfate, un composant très important de la MEC du cartilage (Lee et al., 2015). La dysplasie schneckenbecken est létale durant la période prénatale. Elle est caractérisée par une platyspondylie, un thorax étroit, des os longs courts en formes d'altères, une ossification précoce du tarse et surtout par la conformation en forme d'escargot (*schneckenbecken* en allemand) de l'os iliaque hypoplasique à la radiographie (Figure 19) (Furuichi et al., 2009). Bien qu'il y ait peu d'informations histologiques disponibles chez l'homme, il a été montré que la délétion homozygote du gène SLC35D1 chez la souris induit une réduction significative de la taille de la zone proliférative. Les auteurs ont également identifié une diminution de la quantité d'agrégats de protéoglycanes et de chondroïtines sulfates dans la MEC de cette même zone de la plaque de croissance (Hiraoka et al., 2007).



**Figure 19 : Illustration radiographique de la dysplasie de schneckenbecken.** **A.** Radiographie antéro-postérieure d'un nouveau-né atteint de cette dysplasie. **B.** Radiographie antéro-postérieure du pelvis, avec des iliums (flèche) en forme d'escargot, « *schneckenbecken* » en allemand. Adapté de (Nikkels et al., 2001) et Google Image (escargot).

- **La dysplasie spondylométaphysaire de type Sedaghatian** (OMIM 250220) est une forme létale néonatale de dysplasie spondylométaphysaire caractérisée par une chondrodysplasie métaphysaire sévère, un léger raccourcissement rhizomélisque des membres supérieurs et une platyspondylie légère. Les crêtes iliaques prennent un aspect en dentelle, les péronés sont longs, les os tarsiens sont anormaux, des anomalies cardiaques et des hémorragies pulmonaires sont décrites. Les enfants atteints sont très hypotoniques et ils présentent également des troubles cardio-respiratoires et nerveux sévères. Cette dysplasie est provoquée par une mutation du gène *Glutathione peroxidase 4* (GPX4) impliqué dans la protection de la membrane plasmique contre la peroxydation des lipides (Aygün et al., 2012; Smith et al., 2014). Il n'y a très peu d'information disponible concernant la présence d'éventuelles anomalies histologiques métaphysaires.
- **Le syndrome de Shwachman-Bodian-Diamond (SBD)** (OMIM 260400) est une variante de la maladie précédente, avec des symptômes squelettiques plus légers (nanisme léger à modéré, un thorax étroit), mais provoquant en plus des anomalies hématopoïétiques (cytopénie) et des dysfonctions du pancréas exocrine (Nishimura et al., 2007). Près d'un tiers des patients atteints de cette maladie ont également développé un syndrome myélodysplasique et une leucémie myéloïde aiguë. Cette dysplasie semble être en lien avec des mutations affectant le gène *Shwachman-Bodian-Diamond syndrome ribosome maturation factor* (SBDS) qui est impliqué dans la régulation du raccourcissement des télomères (Liu, Liu, et al., 2018).
- **La dysplasie spondylométaphysaire de type MAGMAS / Mégarbané** (OMIM 613320), provoquée par une mutation du gène *Presequence translocase-associated motor 16* (PAM16) également nommé *Mitochondria-associated granulocyte macrophage colony stimulating factor-signaling molecule* (MAGMAS). Ce gène code pour une protéine mitochondriale impliquée dans la signalisation du facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF). Il joue un rôle dans le transfert de protéines vers la mitochondrie et dans l'homéostasie des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) (Sinha et al., 2010). MAGMAS est spécifiquement exprimé dans l'os

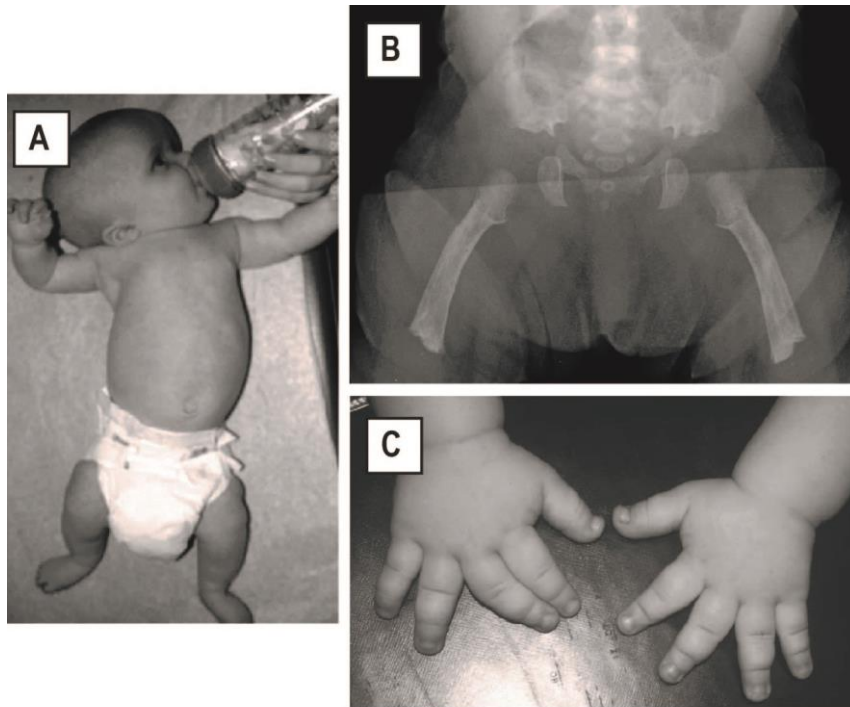
trabéculaire (ostéoblastes) et le cartilage (chondrocytes hypertrophiques) dès les stades précoces du développement. Les mutations ciblant PAM16 induisent une instabilité de la protéine MAGMAS ce qui perturbe l'importation de pré-protéines matricielles dans la mitochondrie et induit de la mort cellulaire (Mehawej et al., 2014). Les patients atteints présentent un retard de croissance pré et postnatal, des fontanelles élargies, une dysmorphie faciale (front proéminent, pont nasal déprimé, nez court, des narines antéversées), un thorax étroit, un abdomen distendu, des membres courts, une platyspondylie sévère, des os longs raccourcis, un élargissement des métaphyses distales, une ossification épiphysaires retardées, des anomalies du bassin (ilium carrés, acetabula horizontaux, ischium hypoplasiques...) (Mégarbané et al., 2014). Aucune information sur d'éventuelles anomalies histologiques n'est disponible dans la littérature.

En plus de ces maladies, il existe d'autres chondrodysplasies qui touchent l'homme et également d'autres espèces. Les plus fréquentes sont celles qui impliquent des formes mutées du récepteur FGFR3. Il existe plusieurs variantes en fonction du type de mutation rencontré et de la sévérité : l'achondroplasie (Figure 20), les dysplasies thanatophores de type I (Figure 21) et II, l'hypochondroplasie, la dysplasie squelettique platyspondylique létale de type San Diego ou encore le syndrome SADDAN (Ornitz & Legeai-Mallet, 2017).

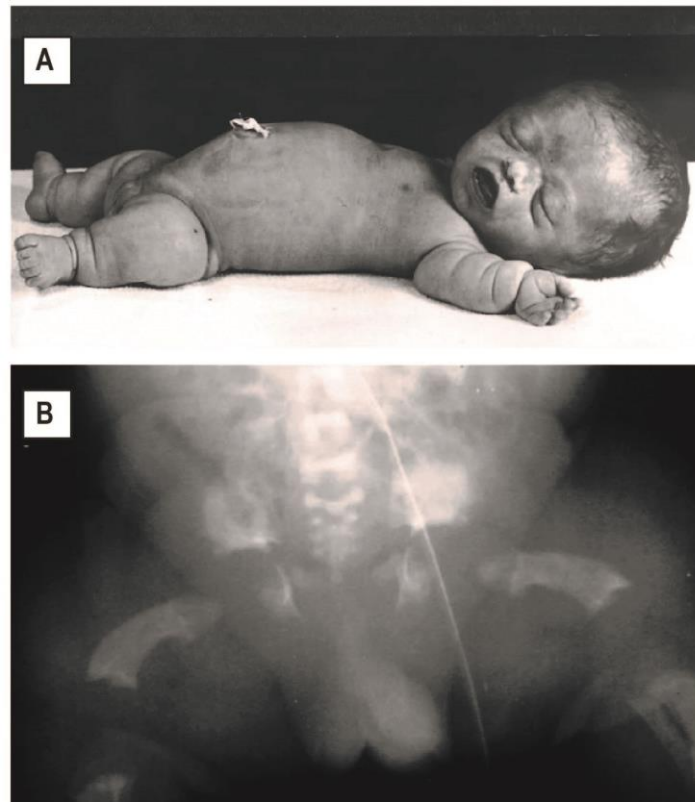
Parmi celles-ci, l'achondroplasie (OMIM 100800) a fait l'objet d'une plus grande attention de la part de la communauté scientifique dû au fait qu'elle est la forme la plus fréquente de nanisme disproportionné avec une prévalence évaluée entre 1 :10000 et 1 :30000 1:25000 (Shirley & Ain, 2013; Waller et al., 2008). Elle se distingue de l'OPS par certains signes cliniques caractéristiques. Les patients sont hypotoniques, présentent un tronc long et étroit, des membres raccourcis, du genu varum, une macrocéphalie avec un front bombé, une hypoplasie de la face médiane et une configuration en trident des mains. Ils présentent également une hyperextensibilité de la plupart de leurs articulations et une cyphose thoracolombaire/hyperlordose lombaire qui s'accroît avec l'âge. Le développement cognitif est parfois altéré et en lien avec la présence d'hydrocéphalie. L'achondroplasie est une maladie progressive dont le phénotype évolue avec l'âge. Avec le temps, on observe une désorganisation progressive de la plaque de croissance et une accélération de la croissance osseuse (Baujat et al., 2008; Cui et al., 2016; Pauli, 2019).

A la différence de l'OPS, cette chondrodysplasie est provoquée pour près de 97% des cas par une mutation autosomale dominante (p.Gly380Arg) située dans la séquence codante pour le domaine transmembranaire du récepteur FGFR3 (Shiang et al., 1994; Webster & Donoghue, 1996; Wilkin et al., 1998). Il en résulte une stabilisation du récepteur FGFR3, une dimérisation accentuée et une activité tyrosine kinase augmentée. Ces phénomènes induisent l'activation continue du récepteur (indépendante de son ligand) avec une perturbation des voies de signalisation situées en aval du récepteur (MAPK, PI3K/AKT, PLCγ et STATs) qui sont à l'origine d'une diminution de la prolifération et de la maturation

des chondrocytes de la plaque de croissance. (Y. Li et al., 1997; Ornitz & Legeai-Mallet, 2017; Su et al., 2010). Dans un modèle de souris exprimant une forme mutée du récepteur FGFR3 (p.Gly374Arg), il a été montré que FGFR3 active ERK1/2, p38 et STAT1 dans la plaque de croissance, prévient l'inhibition de SOX9, induit la formation d'une zone germinale étendue et des zones prolifératives et hypertrophiques réduites. La densité osseuse est également diminuée à la suite d'une activité ostéoclastiques augmentées (L. Chen et al., 1999; Legeai-Mallet et al., 2004; C. Li et al., 1999; Ornitz & Legeai-Mallet, 2017; Raucci et al., 2004; Z. Q. Zhou et al., 2015).



**Figure 20 : Illustration de l'achondroplasie.** **A.** Phénotype corporel d'un nouveau-né atteint d'achondroplasie, avec raccourcissement rhizomélisque des membres et une macrocéphalie. **B.** Radiographie antéro-postérieure du pelvis d'un enfant atteint d'achondroplasie. On distingue un bassin carré, des acétabula horizontaux, des encoches sacrosciatiques étroites et des fémurs courts et robustes. **C.** Mains en trident d'un patient atteint d'achondroplasie illustrant la brachydactylie. Adapté de (Pauli, 2019)



**Figure 21 : Illustration de la dysplasie thanatophores de type I. A.** Phénotype corporel d'un nouveau-né atteint de la dysplasie thanatophores de type I. Les symptômes sont beaucoup plus sévères que lors d'achondroplasie. **B.** Radiographie antéro-postérieur du pelvis, les caractéristiques sont similaires à l'achondroplasie mais sous une forme beaucoup plus sévère. Adapté de (Pauli, 2019)

### 3 LIPIDES ET SIGNALISATION CELLULAIRE

Ce chapitre va se focaliser sur la description des différentes fonctions de l'enzyme SHIP2 et d'une présentation sommaire de l'ensemble des autres protagonistes impliqués autour du métabolisme de SHIP2. Mais avant de les exposer, nous allons brièvement aborder le fonctionnement des deux principales voies de signalisation intracellulaire dans lesquelles SHIP2 est impliqué, la voie PI3K/AKT et la voie MAPK/ERK.

#### 3.1 La voie de signalisation PI3K/AKT

La communication cellulaire est une caractéristique fondamentale des organismes pluricellulaires. Elle permet l'intégration de l'ensemble des activités des cellules qui les constituent. Cette faculté est organisée en un réseau dynamique de signaux extracellulaires reconnus par des cellules cibles qui expriment une protéine réceptrice : un récepteur membranaire. Son extrémité NH<sub>2</sub> se trouve à l'extérieur de la cellule alors que son extrémité COOH est localisée dans la partie intracellulaire. Il existe trois types de récepteurs : des récepteurs canaux-ioniques, de récepteurs enzymes et des récepteurs couplés.

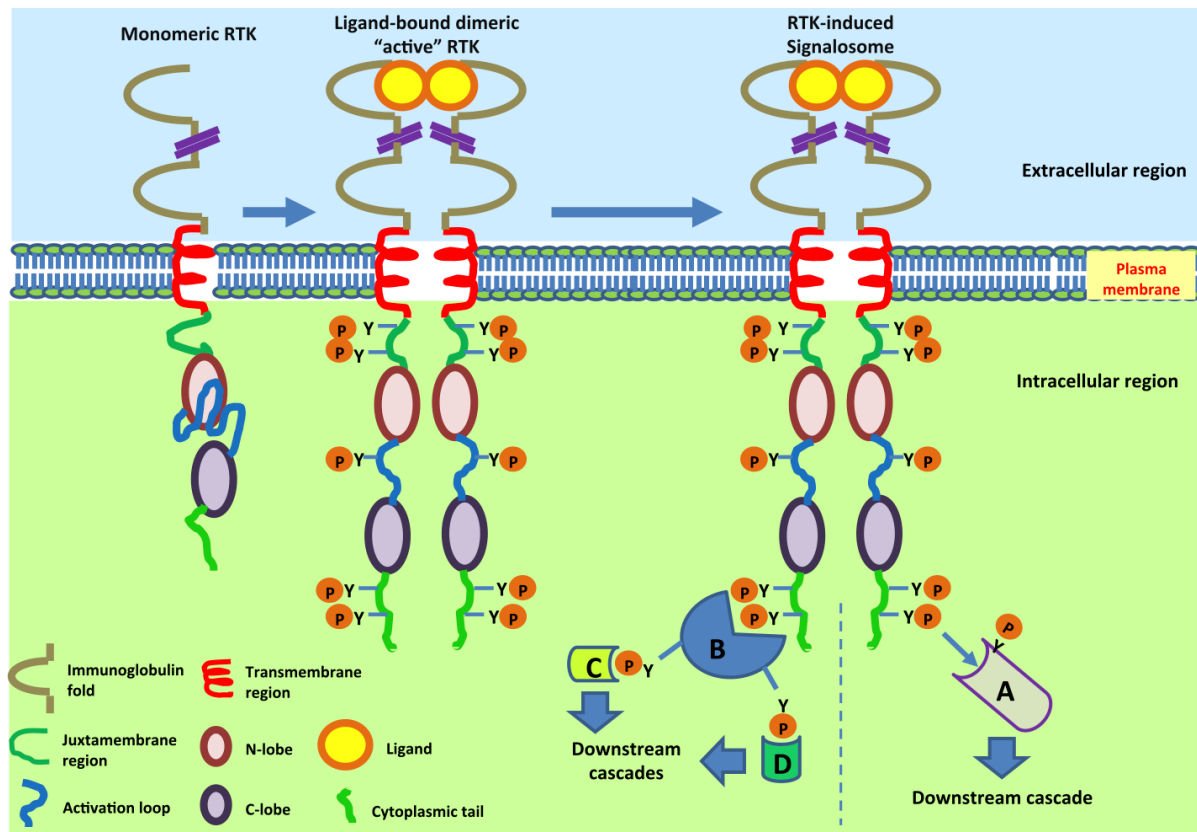
La classe des récepteurs enzymes existent sous forme de monomères, dimères et tétramères. Ils possèdent une double fonction de reconnaissance du signal et d'effecteur. Ils sont sous-classés en 3 familles : les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK), les récepteurs à activité sérine-thréonine kinase, les récepteurs à activité guanylate cyclase. Au total 55 gènes codant pour des RTK ont été repertoriés dans le génome humain. Ceux-ci sont repartis dans 20 familles en fonction du type de ligand auquel ils se lient, de leur séquence homologue, de la structure moléculaire de leur domaine extracellulaire : EGFR, InsR, PDGFR, VEGFR, FGFR, PTK7/CCK4, Trk, Ror, MuSK, Met, Axl, Tie, EphA/B, Ret, Ryk, DDR1/2, Ros, LMR, ALK et SuRTK106/STYK1. (De Meyts, 2000; Lemmon & Schlessinger, 2010).

La voie PI3K/AKT est une cascade de signalisation centrale du métabolisme cellulaire impliquée dans d'importants processus comme la croissance, la prolifération, la survie, la transcription et la synthèse protéique. Cette voie est activée par des récepteurs transmembranaires : récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK), des intégrines, des récepteurs immunitaires (lymphocytes B et T), des récepteurs à cytokines et des récepteurs couplés à des protéines G (GPCR) (De Meyts, 2000; Mayer & Arteaga, 2016).

L'activation des récepteurs à activité tyrosine kinase est obtenue par leur liaison avec un ligand spécifique (récepteur à insuline), ou par la stabilisation du récepteur (récepteur à l'EGF (EGFR)) (Figure 22).



Dans le cadre de la voie de l'insuline, son récepteur spécifique est un récepteur enzyme à activité tyrosine kinase. Il fait partie de la même famille que le récepteur de l'IGF-I (capable de lier l'IGF-I et II) et de l'*Insulin receptor-related receptor* (IRR) (jouant le rôle de capteur de pH) (De Meyts, 2000; Petrenko et al., 2013). Il est composé de deux sous-unités  $\alpha$  extracellulaires, reliées par des ponts disulfures à deux sous-unités  $\beta$  transmembranaires faisant saillies dans le cytoplasme. Il est capable de lier l'insuline, un peptide anabolique sécrété par les cellules  $\beta$  des ilots de Langerhans du pancréas (Guntur & Rosen, 2013).



**Figure 22 : Structure du prototype du récepteur tyrosine kinase et mécanisme d'activation** (Butti et al., 2018). Les récepteurs tyrosine kinases (RTK) sont composés des segments suivants (de N- à l'extrémité C-terminal) : replis d'immunoglobuline, région transmembranaire, région juxtamembranaire, N-lobe, boucle d'activation, lobe C et queue cytoplasmique. Les RTK résident dans la membrane plasmique en tant que monomère. La liaison du ligand fait dimériser des monomères RTK et induit des changements conformationnels qui conduisent à l'autophosphorylation et à l'activation du récepteur. Le RTK phosphorylé sert de site d'amarrage pour des protéines adaptatrices (B.) ou peut directement phosphoryler des molécules de signalisation (A.). Les protéines adaptatrices ou les molécules de signalisation se lient au récepteur phosphorylé via le site 'homologie Src 2 (SH2) ou le domaine de liaison à la phosphotyrosine (PTB). Les protéines adaptatrices ancrées au RTK transmettent alors le signal en phosphorylant d'autres effecteurs (C-D.). Source : (Butti et al., 2018).

En se fixant sur les sous-unités  $\alpha$ , l'insuline va provoquer un changement de conformation du récepteur et activer la fonction tyrosine kinase intrinsèque des deux sous-unités  $\beta$ , ce qui va provoquer une série de réactions d'autophosphorylation sur des résidus tyrosine présents dans la partie intracellulaire des sous-unités  $\beta$  du récepteur. Ces tyrosines phosphorylées vont permettre le recrutement de protéines



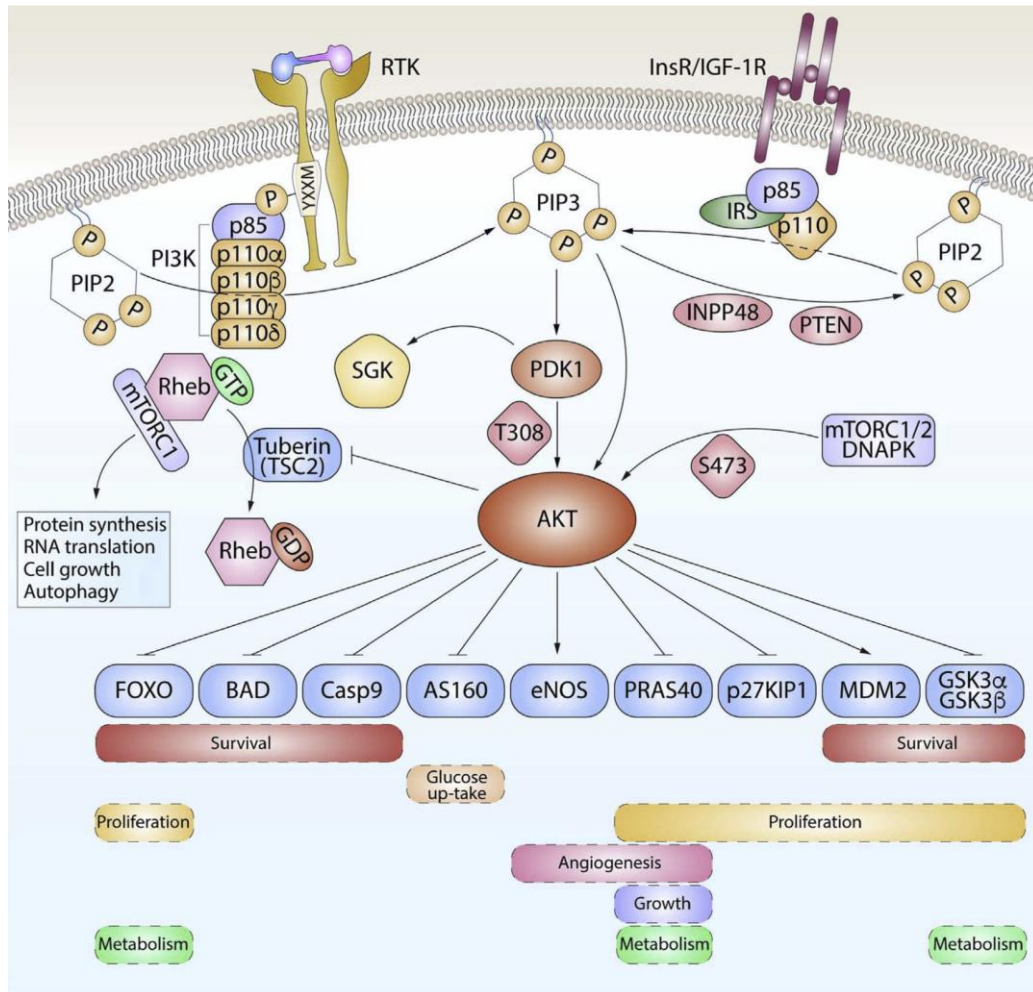
possédant des domaines PTB comme les protéines *Insulin receptor substrate* (IRS). Elles peuvent également recruter des protéines possédant des domaines SH2: SHC, *GRB2 associated binding protein 1* (GAG-1), *Adaptator protein with PH and SH2 domain* (APS), *Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene* (CBL), *SH2B adaptator protein 1* (SH2B1). Ces protéines adaptatrices vont permettre de propager le signal et d'activer différentes voies dont la voie PI3K/AKT (Manning & Toker, 2017; Taniguchi et al., 2006) (Figure 23).

Les protéines IRS sont phosphorylées et vont être reconnues par les domaines SH2 de la sous-unité régulatrice p85 de la PI3K de classe I<sub>A</sub>, ce qui permet d'amener la sous-unité catalytique p110 près de son substrat principal, le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>), et de générer du phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PI(3,4,5)P<sub>3</sub>) (Vanhaesebroeck et al., 2010). Le PI(3,4,5)P<sub>3</sub> induit le recrutement des formes inactives d'AKT et de la kinase dépendante de phosphoinositide 1 (PDK1) via leur domaine PH, depuis le cytoplasme vers la membrane plasmique. Le recrutement de PDK1 induit son activation ce qui lui permet de phosphoryler partiellement PKB/AKT sur la thréonine 308 (T308), synonyme d'activation partielle (Rameh and Cantley 1999).

L'activation d'AKT peut être fortement améliorée via la phosphorylation additionnelle sur la sérine 473 (S473), ce qui permet de stabiliser la phosphorylation sur T308. Cette phosphorylation est obtenue par le recrutement de la cible mécanistique du complexe de rapamycine 2 (mTORC2) et dans d'autres contextes, médiée par la protéine kinase dépendante de l'ADN (DNA-PK), la kinase liée à l'intégrine (ILK) (Osaki, Oshimura, and Ito 2004; Hemmings and Restuccia 2012). Le PI(3,4)P<sub>2</sub> serait également un activateur alternatif d'AKT. Il peut être synthétisé de trois façons : via la déphosphorylation du PI(3,4,5)P<sub>3</sub> grâce à des 5-phosphatases (notamment SHIP1/2), par l'activation de la PI3K de classe II qui va phosphoryler du PI4P, et également par la PI3K de classe I à partir de PI4P (Ebner et al., 2017; Goulden et al., 2019). L'hypothèse de l'implication du PI(3,4)P<sub>2</sub> dans l'activation d'AKT provient du fait qu'AKT contrôle aussi directement des protéines (comme *Forkhead box O* (FOXO)) qui ne sont pas présentes aux niveaux des surfaces membranaires, et où il n'y aurait pas de PI(3,4,5)P<sub>3</sub>. Il serait possible qu'en réalité ces deux PI activent des pools différents d'AKT afin d'accentuer la spécificité du signal transmis (Manning & Toker, 2017). Cette seconde hypothèse est supportée par le fait que la suppression de la PI(3,4)P<sub>2</sub> phosphatase *Inositol polyphosphate-4-ohosphatase Type II B* (INPP4B) induit une augmentation concomitante du PI(3,4)P<sub>2</sub> et de l'activation d'AKT2 (Li Chew et al., 2015).

Une fois activée, AKT contrôle de très nombreux substrats impliqués dans une multitude de processus cellulaires et physiologiques majeurs (prolifération cellulaire, survie, croissance, migration cellulaire, réponse immunitaire, angiogenèse, réponse à l'insuline, fonction neuronale...) (Cain & Ridley, 2009; Heras-Sandoval et al., 2014; Phan et al., 2019; Yu & Cui, 2016). AKT peut directement phosphoryler des protéines, des enzymes *Glycogen synthase kinase 3* (GSK3), *Tuberous sclerosis complex 2* (TSC2), des facteurs de transcription (FOXO), des régulateurs du cycle cellulaire...(Manning & Toker, 2017).

La durée pendant laquelle AKT est entièrement activée près de la membrane plasmique est relativement courte (quelques heures post-stimulation), avec un pic d'activation allant de quelques secondes à plusieurs minutes en fonction du type cellulaire (Kunkel et al., 2005).

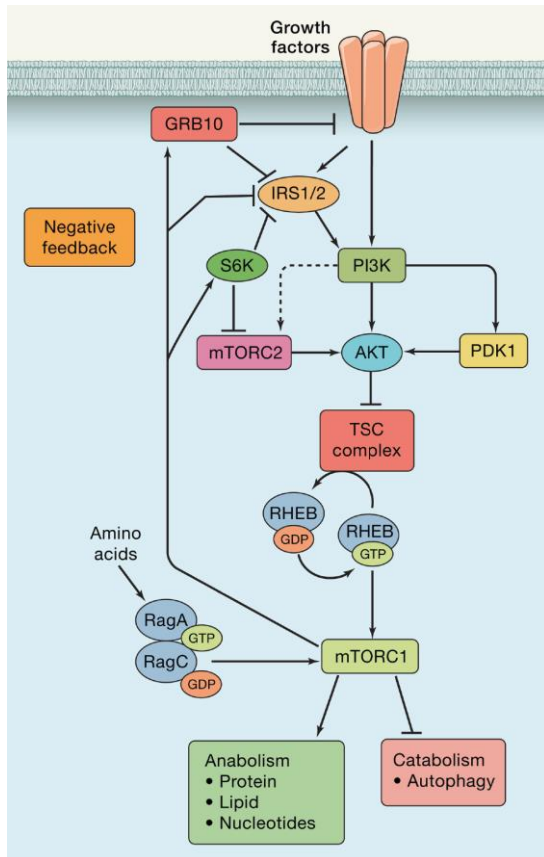


**Figure 23 : La voie de signalisation PI3K/AKT** (O'Donnell et al., 2018). La fixation de l'insuline entraîne l'activation du récepteur, la phosphorylation spécifique de tyrosines présentes dans ses portions intracellulaires et le recrutement à leur niveau de nombreuses protéines adaptatrices. Les protéines IRS vont être recrutées, phosphorylées sur tyrosines et reconnues par le domaine SH2 de la sous-unité régulatrice p85 de la PI3K. La sous-unité catalytique p110 de la PI3K peut alors phosphoryler le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>) et générer un second messager, le phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PI(3,4,5)P<sub>3</sub>). Ce dernier va être la cible de protéines possédant des domaines *pleckstrin homology* (PH) comme PDK1 et AKT. AKT va être phosphorylé sur T308 par PDK1 et sur S473 par le complexe mTORC2. Une fois complètement activée, AKT va phosphoryler une série de substrats comme GSK3B, des facteurs de transcription FOXO, MDM2, BAD et p27KIP... AKT est impliqué dans de nombreux processus cellulaires importants comme la survie et la prolifération cellulaire. Les phosphatases SHIP2 et PTEN vont notamment contribuer à réguler négativement cette signalisation en déphosphorylant le PI(3,4,5)P<sub>3</sub>. Source (O'Donnell et al., 2018).

Comme toutes les voies de signalisation, la voie PI3k/AKT est sujette à des régulations et des phénomènes de feedback afin de s'assurer que les signaux stimulateurs sont transmis de manière transitoire et proportionnée (Manning & Toker, 2017). La concentration en PI(3,4,5)P<sub>3</sub> est régulée par plusieurs enzymes comme la 3-phosphatase *Phosphatase and Tensin homolog* (PTEN) et des 5-phosphatases (dont SHIP1/2). Ces enzymes peuvent réduire la concentration en PI(3,4,5)P<sub>3</sub> et par conséquent l'activation d'AKT, ce qui permet d'éviter une suractivation de la voie de signalisation (Manning & Toker, 2017; Vanhaesebroeck et al., 2010). A noter qu'en plus des sites de phosphorylation T308 et S473, il existe d'autres sites de phosphorylation et des modifications post-traductionnelles d'AKT qui pourraient servir à phénotyper le signal transmis (Manning & Toker, 2017).

Faisant partie des cibles d'AKT, la cible mécanistique du complexe de rapamycine 1 (mTORC1) joue un rôle important d'inhibition de l'activation d'AKT en stimulant la dégradation des protéines IRS1/2 dans la voie de l'insuline et de l'IGF-1 (Shah & Hunter, 2006) (Figure 24). mTORC1 peut également stabiliser le *Growth factor receptor bound protein 10* (GRB10), une protéine adaptatrice capable d'atténuer le signal émanant des récepteurs à insuline/l'IGF-1 et des protéines IRS1/2 (Yu et al., 2011). Il existe aussi des mécanismes de feedback faisant intervenir la régulation de l'expression protéique des RTK, et exercés par les facteurs de transcription FOXO. Cet effet est notamment mis en évidence par l'inhibition prolongée de la signalisation d'AKT engendrant une augmentation de l'expression des récepteurs à l'IGF-1 (Chandralapaty et al., 2011; Manning & Toker, 2017). Enfin, il existe également de manière physiologique des protéines capables d'inactiver directement AKT. La protéine phosphatase A2 (PP2A) est capable de déphosphoryler AKT sur T308, et les protéines phosphatases *PH domain and Leucine rich repeat Protein Phosphatase* (PHLPP1/2) sont capables de déphosphoryler AKT sur S473 (Brognard et al., 2007; Padmanabhan et al., 2009).

A la suite de mutations génétiques, la voie PI3K/AKT est régulièrement impliquée dans le développement de tumeurs. Typiquement, ces mutations peuvent conduire à l'amplification d'effecteurs ayant des propriétés oncogéniques (EGFR, PDK1, *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha* (PIK3CA)), à l'inactivation d'effecteurs aux propriétés suppresseurs de tumeur (PTEN, INPP4B, *PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase 1* (PHLPP)), ou directement affecter AKT (Mayer & Arteaga, 2016).



**Figure 24 : Régulation de l'activation de la voie PI3K/AKT par un phénomène de feedback négatif par le complexe mTORC1** (Manning & Toker, 2017). Faisant partie des cibles d'AKT, la cible mécanistique du complexe de rapamycine 1 (mTORC1) joue un rôle important d'inhibition de l'activation d'AKT en stimulant la dégradation des protéines IRS1/2 dans la voie de l'insuline/l'IGF-1 et la stabilisation de GRB10, une protéine adaptatrice capable d'atténuer le signal émanant des récepteurs à insuline/l'IGF-1 et des protéines IRS1/2. Sources : (Manning & Toker, 2017; Shah & Hunter, 2006; Yu et al., 2011).

### 3.2 La voie de signalisation MAPK/ERK

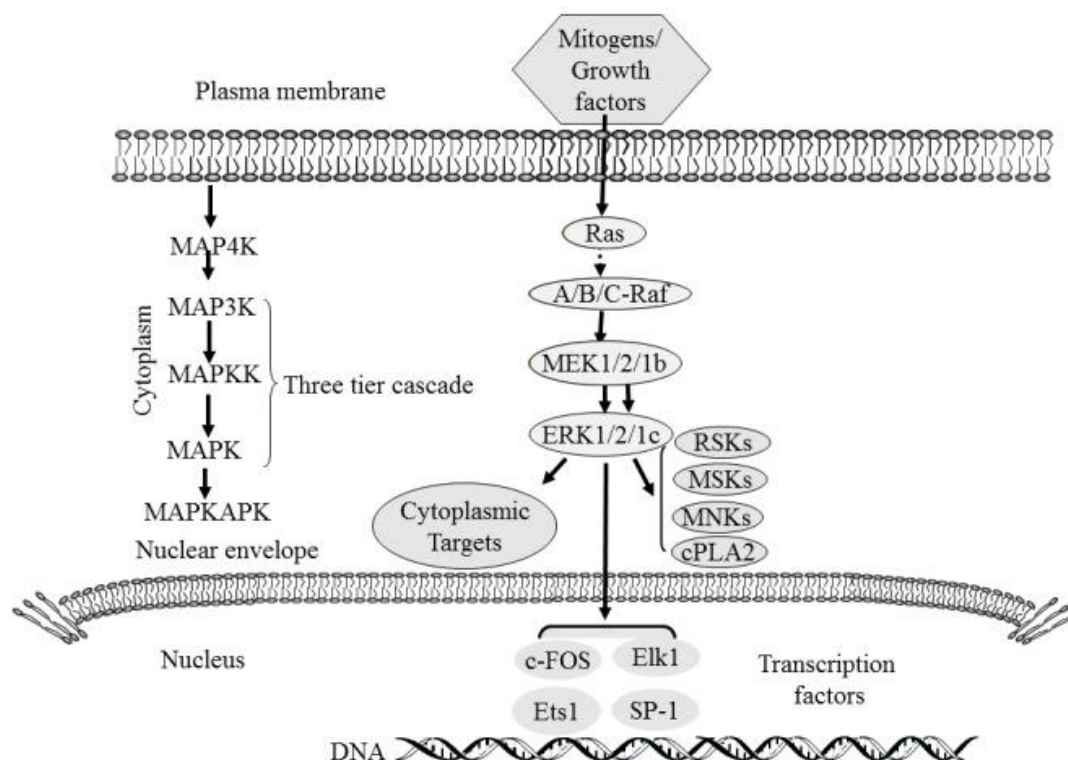
Les voies de signalisation des *Mitogen-activated protein kinase* (MAPK) sont composées de protéines kinases spécifiques pour des résidus sérine/thréonine ou tyrosine, séquentiellement activées et faisant partie intégrante d'une série de voie de transduction du signal qui régulent les processus de prolifération, de différenciation et de mort cellulaire (Morrison, 2012) (Figure 25).

Chaque cascade d'activation débute par la phosphorylation et l'activation d'un récepteur RTK ou GPCR, elle-même initiée par des signaux extracellulaires spécifiques (Cuevas et al., 2007). La transmission du signal depuis le récepteur va s'opérer par l'activation séquentielle de trois à cinq protéines kinases (pour lesquelles un nom générique leur a été attribué en fonction de leur position dans la voie) : *MAPK kinase kinase kinase* (MAP4K), *MAPK kinase kinase* (MAP3K), *MAPK kinase* (MAPKK), *MAPK* et *MAPK-activated protein kinases* (MAPKAPK). Les kinases MAP3K, MAPKK et MAPK constituent le corps commun présent dans toutes les cascades de signalisation des MAPK, alors que les autres apparaissent seulement dans certaines d'entre elles (Guo et al., 2020). Les trois principales cascades de signalisation sont la voies MAPK/ERK, MAPK/JNK et p38 MAPK. Les voies *c-Jun terminal kinase 1,2,3* (JNK1,2,3) et p38 MAPK (p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$ , and p38 $\delta$ ) sont principalement liées au stress cellulaire et à l'apoptose (Braicu et al., 2019). La voie MAPK/ERK est celle qui a été la

plus étudiée et est étroitement liée à la prolifération et la différenciation cellulaire. Cette voie peut être activée de plusieurs façons : (i) activation d'un récepteur tyrosine kinase ; (ii) activation médiée par PKC ; (iii) activation par un récepteur couplé une protéine G ; (iv) activation par le  $\text{Ca}^{2+}$  (Lawrence et al., 2008).

Quand un signal extracellulaire se lie à un récepteur transmembranaire (typiquement FGF sur le récepteur FGFR, ou EGF sur le récepteur EGFR), celui-ci devient phosphorylé sur une tyrosine ce qui permet aux domaines SH2 de la protéine *Growth factor receptor-binding protein 2* (GRB2) de s'y lier. Celle-ci va ensuite interagir par ses domaines *SRC homology 3 domain* (SH3) avec la séquence C terminale riche en proline du facteur d'échange de nucléotide *Son of sevenless* (SOS), afin de former le complexe récepteur-GRB2-SOS (Bandaru et al., 2019).

Ce complexe induit l'activation de SOS qui va induire l'activation de la protéine kinase *Rat sarcoma viral oncoprotein* (RAS). Cette petite protéine G est encodée par les oncogènes *Harvey RAS proto-oncogene* (HRAS), *Kirsten RAS proto-oncogene* (KRAS) et *Neuroblastoma RAS proto-oncogene* (NRAS). RAS alterne entre deux conformations (forme active GTP, forme inactive GDP) afin de réguler la transduction du signal. L'interaction de RAS-GDP avec SOS activé induit le remplacement du GDP par un GTP (Simanshu et al., 2017).



**Figure 25 : La cascade de signalisation MAPK/ERK** (Guo et al., 2020). Les MAPK catalysent la phosphorylation de dizaines de protéines cytosoliques et de nombreux facteurs de transcription nucléaire. MAPK, protéine kinase activée par un mitogène; MAP4K, MAPK kinase kinase; MAP3K, MAPK kinase kinase; MAPKK, MAPK kinase; MAPKAPK, protéine kinase activée par mitogène protéine kinase; MEK, Ras / Raf / MAPK; RSK, ribosomal s6 kinase; MSK, protéines kinases activées par les mitogènes et le stress; MNK, sérine / thréonine-protéine kinases interagissant avec MAP

kinase; cPLA2, phospholipase A2 cytosolique; c-FOS, proto-oncogène c-Fos; Elk1, protéine Elk-1 contenant un domaine ETS; Ets1, protéine C-ets-1; SP-1, facteur de transcription Sp1. Adapté de (Guo et al., 2020).

La forme active RAS-GTP va ensuite interagir et activer les oncogènes RAF. Cette famille de protéine existe sous trois formes (*RAF-1 proto-oncogene* (RAF1), *A-RAF proto-oncogene* (ARAF) et *B-RAF proto-oncogene* (BRAF)) dont leur activité, distribution et modalité de régulation diffèrent. Elles peuvent être activées de plusieurs manières : (i) par relocalisation près de la face interne de la membrane plasmique après interaction avec RAS ; (ii) par dimérisation ; (iii) par (dé)phosphorylation à différents sites ; (iv) par dissociation de la protéine kinase inhibitrice de RAF ; (v) en se liant à une protéine kinase inhibitrice de RAS (Roskoski, 2019).

L'activation de RAF permet à son domaine catalytique C-terminale d'interagir et d'activer la *Mitogen-activated protein kinase kinase* (MEK), par phosphorylation du résidu sérine situé dans sa région catalytique. MEK existe deux sous-types (MEK1 et MEK2) qui possèdent une double spécificité kinase pour les résidus tyrosine et thréonine de la kinase ERK. Cette caractéristique permet d'améliorer la précision de la transmission du signal en réduisant les erreurs d'activation (Guo et al., 2020; Muta et al., 2019).

Une fois activée, MEK ancre la protéine kinase ERK dans le cytoplasme, et induit la double phosphorylation de ses résidus tyrosine et thréonine. Tout comme MEK, ERK existe sous plusieurs formes (ERK1, 2, 3, 5 et ERK6). ERK1 et ERK2 sont les formes impliquées dans la voie de signalisation MAPK/ERK. La double phosphorylation de ERK1/2 stimule sa dimérisation et son ancrage dans le cytoplasme. La forme activée peut également transloquer du cytoplasme vers le noyau (Avruch et al., 2001; Guo et al., 2020).

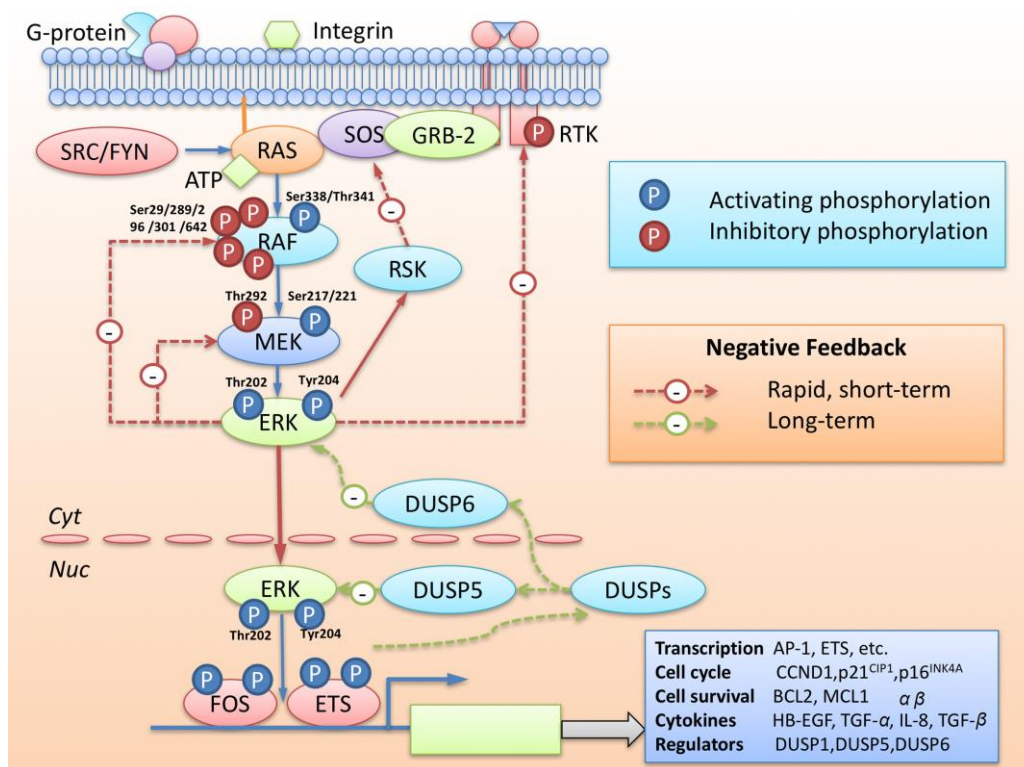
Lorsque ERK1/2 est présent dans le cytoplasme, il va phosphoryler des composants du cytosquelette (*Microtubule associated protein* (MAP), afin par exemple de participer à la régulation de la morphologie cellulaire. Dans le noyau, ses cibles sont multiples : phosphorylation de facteurs de transcription afin d'induire l'expression de gène, réguler la prolifération, la différenciation, l'apoptose (Eblen, 2018).

Cette voie de signalisation fait l'objet d'un contrôle homéostatique via des boucles de rétrocontrôles (Figure 26). Ils existent un feedback rapide et un feedback retardé (McCubrey et al., 2007). Le feedback rapide fait référence au fait que les protéines kinases ERK1/2 activées vont limiter la propagation du signal en stimulant également des phosphorylations inhibitrices sur des molécules situées en amont de la voie de signalisation (MEK, RAF, SOS, RTK) (Dougherty et al., 2005). Par exemple, ERK1/2 phosphoryle RAF1 et BRAF afin d'inhiber la phosphorylation de MEK (Eblen et al., 2004). Le feedback retardé consiste en l'expression de nouvelles protéines (*Sprouty RTK signaling antagonist* (SPRY), phosphatases à double spécificité (DUSP)) afin de conduire à la déphosphorylation de ERK1/2 (Caunt & Keyse, 2013). Les protéines SPRY inhibent le RTK et SOS en interférant avec un domaine catalytique



de RAF. Les DUSP déphosphorylent le motif p-T-E-pY de ERK afin d'inactiver sa fonction (Liu, Yang, et al., 2018).

Cette voie de signalisation est souvent impliquée dans la formation de tumeurs. En effet, l'apparition de mutation génétique affectant ses intervenants peut conduire à une activation aberrante induisant des effets prolifératifs et anti-apoptotiques excessifs. L'expression de la protéine kinase ERK et son niveau de phosphorylation sont augmentés dans de nombreux cancers humains, comme le cancer du colon, du sein, de l'ovaire et des poumons (Guo et al., 2020). Une activation continue de la voie MAPK/ERK favorise la transformation néoplasique de cellules saines en cellules tumorales. Ce comportement favorise également l'invasion tumorale et le développement de métastases par augmentation de l'expression des MMP2 et MMP9 et d'enzymes protéolytiques capables d'hydrolyser la matrice extracellulaire (Gialeli et al., 2011).



**Figure 26 : Activation et régulation par feedback de la cascade de signalisation MAPK** (Liu, Yang, et al., 2018). L'activation d'un récepteur tyrosine kinase (RTK) active RAS en recrutant des protéines adaptatrices (par exemple, GRB-2) et des facteurs d'échange (par exemple, SOS). L'activation du RAS favorise la formation de dimères de RAF, qui activent la cascade MEK-ERK par phosphorylation. L'activité de la voie ERK est régulée par des feedbacks négatifs à plusieurs niveaux, y compris par l'activation transcriptionnelle des protéines DUSP qui régulent négativement la voie. Par phosphorylation directe, ERK régule aussi directement l'activité de CRAF et MEK. ERK, où son substrat immédiat RSK, phosphoryle également SOS sur plusieurs résidus, inhibant son activité et régulant ainsi négativement l'activité du RAS. Adapté de (Liu, Yang, et al., 2018).

Cette activation aberrante provient souvent de l'apparition de mutations d'effecteurs de la voie de signalisation. Par exemple, l'oncogène RAS est muté dans 25% des cancers, notamment celui affectant le pancréas (Hobbs et al., 2016). BRAF est également sujet à mutation gain de fonction. Cette kinase est mutée dans 100% des leucémies à tricholeucocytes et dans la moitié des mélanomes (Holderfield et al., 2014). Bien que l'utilisation d'inhibiteurs de l'activité de la voie de MAPK permettrait de ralentir ce phénomène, leurs effets sont souvent inhibés par le développement de résistances médicamenteuses (Liu, Yang, et al., 2018).

### 3.3 Cross-talk entre les voies PI3K/AKT et MAPK/ERK

Les voies de signalisation ne sont pas des autoroutes cloisonnées. Il existe des bretelles permettant à une voie d'exercer une régulation croisée sur une autre. Le sens de ces interactions diffère en fonction du point de régulation. Certains mécanismes permettent aux voies de s'inhiber mutuellement, d'autres leur permettent de coopérer afin de fournir un signal plus intense (Manning & Toker, 2017).

La voie PI3K/AKT possède des points de régulation croisés avec d'autres voies, comme par exemple avec la voie MAPK/ERK. AKT exerce un effet inhibiteur sur la voie MAPK/ERK en recrutant la protéine 14-3-3 et en induisant la phosphorylation du motif S259 de RAF1 et de S364 de BRAF. Cela a comme conséquence de prévenir leur activation, tout comme celle de ERK et d'inhiber la voie MAPK/ERK (Dumaz & Marais, 2003).

Etant donné que ces deux voies de signalisation sont parfois activées par les même RTK, les phénomènes de feedback négatif exercés par l'une d'entre elles sur le RTK et/ou ses protéines adaptatrices, peut affecter également l'autre voie de signalisation. En supprimant l'activation médiée par le RTK par l'intermédiaire des protéines adaptatrices *Grb2-associated binder 1 and 2* (GAB1/2), ERK activé peut abolir l'activation de la voie de PI3K/AKT (Mendoza et al., 2011). Enfin, en partageant certaines cibles (mTORC1, FOXO, GSK3..) et en contrôlant des processus cellulaires parfois identiques, les voies PI3K/AKT et MAPK/ERK peuvent agir de concert (Manning & Toker, 2017; Mendoza et al., 2011).

### 3.4 Phosphoinositides

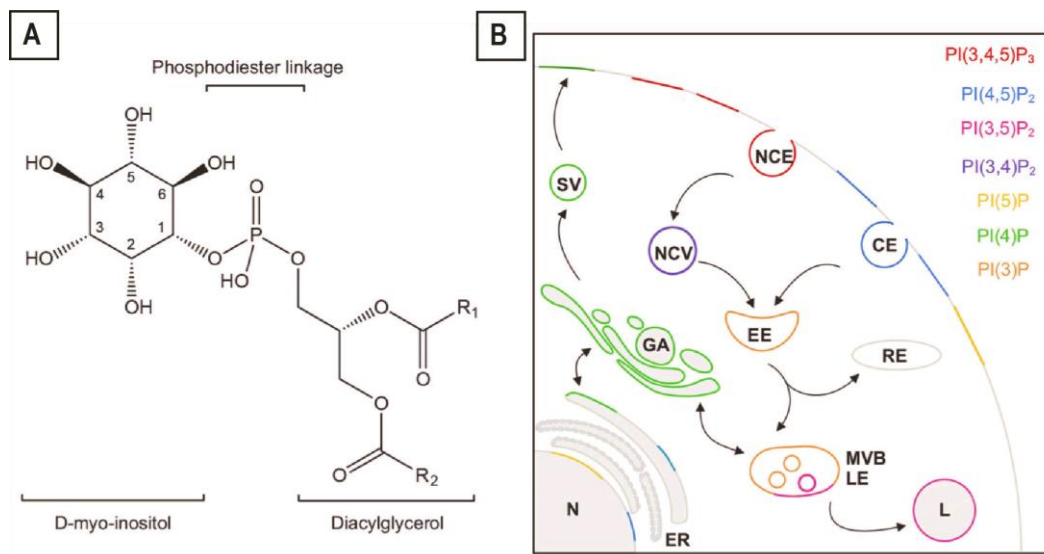
Les phosphoinositides (PI) sont des glycérophospholipides anioniques présents dans les membranes des cellules eucaryotes. Depuis leur découverte dans les années 70 et 80, ces lipides n'ont cessé de susciter un grand intérêt dans la communauté scientifique (Balla, 2013). En effet, malgré leur faible abondance, ce sont des éléments de structure essentiels de toutes les membranes eucaryotes, car ils coordonnent de nombreux aspects du trafic membranaire et des voies de signalisation. Ils sont constamment soumis à des modifications métaboliques en fonction des besoins de la cellule afin d'assurer le maintien de son intégrité structurale. Ils sont dès lors impliqués dans des fonctions variées et aussi essentielles que la



prolifération, la division cellulaire, l'apoptose, la motilité, le trafic vésiculaire, la perméabilité et le transport membranaire (Burke, 2018). De manière générale, les PI possèdent deux groupes de fonctions : d'une part leur rôle de second messenger dans des voies de signalisation, et d'autre part les fonctions découlant de leur capacité d'interaction avec d'autres protéines.

Précurseur de tous les phosphoinositides, le phosphatidylinositol (PtdIns) est constitué d'un cycle myo-inositol-1-phosphate (Ins(1)P), représentant la tête polaire, liée par son groupement phosphate et via une liaison phosphodiester à une molécule de diacylglycérol (DAG) (Figure 27A). Les deux chaînes d'acide gras qui composent le DAG et qui permettent l'insertion dans la bicouche lipidique de la membrane sont enrichies en acide stéarique (chaîne en position sn-1) et en acide arachidonique (chaîne en position sn-2) (Berridge & Irvine, 1989; Blunsom & Cockcroft, 2020). Le cycle myo-inositol possède cinq groupements hydroxyles et peut faire l'objet de différentes phosphorylations (Burke, 2018). Seuls les hydroxyles présents en position D3, D4 et D5 sont phosphorylés naturellement afin de générer les 7 différents phosphoinositides :

- Phosphatidylinositol monophosphates : PI(3)P, PI(4)P, PI(5)P
- Phosphatidylinositol bisphosphates : PI(3,4)P<sub>2</sub>, PI(3,5)P<sub>2</sub>, PI(4,5)P<sub>2</sub>
- Phosphatidylinositol trisphosphate : PI(3,4,5)P<sub>3</sub>



**Figure 27 : Structure et distribution cellulaire des phosphoinositides** (Phan et al., 2019). **A.** Structure chimique du phosphatidylinositol composé d'un cycle D-myo-inositol (Ins(1)P) lié par son groupement phosphate à un diacylglycérol (DAG) par une liaison phosphodiester. Le DAG comprend 2 longues chaînes d'acides gras (R1 et R2) qui permettent lorsque le phosphoinositide est membranaire, son insertion dans la bicouche lipidique de la membrane plasmique. Les hydroxyles (OH) en position 3, 4 et 5 du cycle D-myo-inositol peuvent être phosphorylés pour donner les différents phosphoinositides (PI). **B.** Localisation des différents PI. Cette carte représente la localisation cellulaire des PI où ils sont présents majoritairement. CE : clathrin-dépendant endocytosis, NCE clathrin independent endocytosis, NCV non-clathrin endocytic vesicles, EE early endosomes, RE recycling endosomes, MVB multivesicular bodies, LE late endosomes, L lysosome, ER endoplasmic reticulum, N nucleus, GA Golgi

apparatus, SV secretory vesicles. Les flèches noires indiquent la progression du trafic vésiculaire. Source : (Phan et al., 2019).

Le PtdIns est beaucoup plus abondant que les PI car il représente entre 10 et 20% des phospholipides cellulaires totaux. Les formes phosphorylées sont en revanche beaucoup moins abondantes. Le phosphatidylinositol-4-phosphate (PI(4)P) et le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>) représenteraient moins de 1%. Les phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PI(3,4,5)P<sub>3</sub>), phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate (PI(3,4)P<sub>2</sub>), phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate (PI(3,5)P<sub>2</sub>) constitueraient moins de 0,1% des phosphoinositides totaux. De plus, ces valeurs sont à pondérer en fonction du type cellulaire, mais également en fonction de l'espèce dont il est question (Balla, 2013).

Le PtdIns est synthétisé dans le réticulum endoplasmique par la PtdIns synthase à partir de cytidine diphosphate diacylglycérol (CDP-DAG) et de myo-inositol. Il est ensuite distribué à travers la cellule par des protéines de transfert *Phosphatidylinositol transfer protein* (PIPT) et le trafic vésiculaire.

Les différents PI sont distribués dans la partie cytoplasmique de la membrane plasmique et dans les membranes des différents organelles subcellulaires, où ils sont impliqués dans différents processus cellulaires (Phan et al., 2019). On les retrouve également dans le noyau sous une forme non-membranaire (Shah et al., 2013) (Figure 27B).

Dans le cadre de cette introduction, nous focaliserons notre attention sur les phosphoinositides impliqués dans le métabolisme de l'enzyme SHIP2 : PI(4)P, PI(4,5)P<sub>2</sub>, PI(3,4)P<sub>2</sub> et PI(3,4,5)P<sub>3</sub>.

### 3.4.1 PI(4,5)P<sub>2</sub>

Le PI(4,5)P<sub>2</sub> (également appelé PIP<sub>2</sub>) est le PI le plus abondant. Il est présent sur la face cytosolique de la membrane plasmique (principalement aux sites de remodelage), près des domaines nucléaires enrichis en facteurs d'épissage de pre-ARNm (*nuclear speckles*), dans le reticulum endoplasmique, dans l'appareil de Golgi, les cavéoles, les autophagosomes, les lysosomes et les endosomes, aux sites d'adhésion focaux et près des jonctions entre cellules épithéliales (Di Paolo & De Camilli, 2006; Dickson et al., 2014). Il est principalement synthétisé dans la face cytosolique de la membrane plasmique par la phosphorylation du PI(4)P par les différentes isoformes de la kinase phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase (PIP5K), et où chaque isoforme est responsable de la synthèse d'un pool de PI(4,5)P<sub>2</sub> (Blunsom & Cockcroft, 2020; Kolay et al., 2016). A noter que grâce à sa fonction 3-phosphatase, l'enzyme PTEN est également à l'origine de la synthèse de PI(4,5)P<sub>2</sub>. PTEN est capable d'hydrolyser le PI(3,4,5)P<sub>3</sub> pour former du PI(4,5)P<sub>2</sub>, ce qui diminue l'activation de l'axe phosphoinositide 3-kinase / protéine kinase B (PI3K/AKT) et se traduit par un effet suppresseur de tumeur (Gericke et al., 2013).

Le PI(4,5)P<sub>2</sub> est un messager intermédiaire essentiel dans deux voies de signalisation importantes car il sert de substrat dans la voie *Phosphoinositide-specific phospholipase C* / inositol-1,4,5-trisphosphate

(PLC/ IP<sub>3</sub>/DAG) et dans la voie PI3K/AKT (Phan et al., 2019). La PLC activée va hydrolyser le PI(4,5)P<sub>2</sub> en DAG et IP<sub>3</sub>. Le DAG va rester près de la membrane plasmique afin de recruter et activer la protéine kinase C (PKC) qui va moduler de nombreux effecteurs impliqués dans des processus importants comme la régulation de la transcription et la croissance cellulaire. L'IP<sub>3</sub> va quant à lui migrer vers le réticulum endoplasmique lisse, se fixer sur un récepteur à IP<sub>3</sub> et provoquer la libération de calcium dans le cytoplasme via l'ouverture de canaux calciques afin d'induire une réponse cellulaire (Berridge & Irvine, 1984; M, 1996; Meldrum et al., 1991; Phan et al., 2019).

L'activation de récepteurs membranaires provoque le recrutement et la phosphorylation du PI(4,5)P<sub>2</sub> par la PI3K de classe I afin de former du PI(3,4,5)P<sub>3</sub>, ce qui va permettre le recrutement et l'activation d'AKT et le déclenchement d'une cascade de signalisation qui va orchestrer de nombreux processus cellulaires et physiologiques (prolifération cellulaire, survie, croissance, migration cellulaire...) (Cain & Ridley, 2009; Heras-Sandoval et al., 2014; Phan et al., 2019; Yu & Cui, 2016).

Tout comme la plupart des autres PI, le PI(4,5)P<sub>2</sub> est sujet aux interactions protéiques. Il régule l'activité et la localisation subcellulaire de protéines capables de se lier à l'actine, ce qui en fait un acteur important de la régulation du remodelage membranaire et du cytosquelette d'actine. De manière générale, l'interaction avec le PI(4,5)P<sub>2</sub> inhibe les protéines induisant le désassemblage/non-assemblage des filaments d'actine (ADF, CAPZ), et stimule les protéines qui favorisent la polymérisation/nucléation des filaments d'actine (EZRINE/RADIXINE/MOESINE, *Wiskott-aldrich syndrome protein* (WASP), complexe *Actin-related protein 2/3* (ARP 2/3)) (Phan et al., 2019; Saarikangas et al., 2010). Ces propriétés permettent au PI(4,5)P<sub>2</sub> d'agir comme un régulateur de nombreux processus cellulaires (endocytose, exocytose, migration, adhésion cellulaire). Il va notamment promouvoir l'activation de la *Focal adhesion kinase* (FAK) par la formation de cluster, et son autophosphorylation près des adhésions focales (Goñi et al., 2014). FAK est une protéine qui joue le rôle d'intégrateur de signaux de facteurs de croissance. En recrutant les protéines de la famille *Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src* (SRC), elle contrôle des mécanismes clés comme la survie cellulaire, la migration et la prolifération. Elle est d'ailleurs régulièrement impliquée dans le développement de certains cancers et dans le processus de métastases (Zhao & Guan, 2009).

Le PI(4,5)P<sub>2</sub> possède un double rôle dans la signalisation de récepteur de facteur de croissance car il est parfois nécessaire pour l'atténuation du signal des réactions qu'il propage. Par exemple, l'interaction du PI(4,5)P<sub>2</sub> avec les protéines adaptatrices de la clathrine provoque leur recrutement près la membrane plasmique ce qui conduit à l'internalisation de récepteurs membranaires activés. Mais après internalisation, le désassemblage des protéines adaptatrices de la clathrine sur les vésicules d'endocytose nécessite la dégradation du PI(4,5)P<sub>2</sub> par les phosphatases de la famille des synaptojanines (SYNJ) (Abe et al., 2008; Grabon et al., 2019; Haffner et al., 2000; Zoncu et al., 2007).

Le pool de PI(4,5)P<sub>2</sub> est régulé à plusieurs niveaux par une série d'enzymes. La phosphatase *Inositol polyphosphate-5-phosphatase 1* (OCRL1) dégrade le PI(4,5)P<sub>2</sub> près endosomes précoces et des lysosomes. La perte d'OCRL1 induit, par ailleurs, des anomalies dans la cinétique de l'endocytose (Nández et al., 2014). Au niveau de la membrane plasmique des synapses, le PI(4,5)P<sub>2</sub> est régulé par synaptojanine 1 (SYNJ1) afin de réguler l'endocytose (McPherson et al., 1996). Le PI(4,5)P<sub>2</sub> est également dégradé par SHIP2 afin de donner du PI(4)P. Par ailleurs, en l'absence de SHIP2 dans un modèle de cellules de glioblastome 1321 N1, on observe une augmentation de la concentration en PI(4,5)P<sub>2</sub> se traduisant par une augmentation de la migration cellulaire. La protéine myosine-1c capable de lier le PI(4,5)P<sub>2</sub> a notamment été identifiée comme un partenaire de SHIP2 (Elong Edimo et al., 2016b).

### 3.4.2 PI(4)P

Le PI(4)P est un autre PI très abondant qui est un composant essentiel pour la synthèse, le transport et la maturation de vésicules sécrétoires (Viaud & Payraastre, 2015). Il est présent dans les membranes de l'appareil de Golgi, les compartiments endosomaux, sur les vésicules d'exocytose et près de la membrane plasmique (Dickson et al., 2014). Le PI(4)P est généré par des phosphatidylinositol 4-Kinase (PI4K) de classe II et III à la sortie du réticulum endoplasmique (RE) et près de l'appareil de Golgi. Le rapprochement du RE avec l'appareil de Golgi (*trans*-Golgi) fait intervenir le PI(4)P qui est échangé contre du cholestérol via les protéines *Oxysterol-binding protein* (OSBP) (Mesmin et al., 2017). Il constitue également le produit de l'hydrolyse du PI(4,5)P<sub>2</sub> par les phosphatases SHIP2, OCRL1 et SYNJ1 (Ramos, Ghosh, & Erneux, 2019).

Le PI(4)P régule le transport vésiculaire de l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique et les compartiments endosomaux. Il participe à la formation de vésicules en créant des déformations membranaires en recrutant le complexe de protéines adaptatrices de la clathrine (GGA) et *ADP-ribosylation factor 1* (ARF1) (Wang et al., 2007). Le PI(4)P permet le transport des protéines du *trans*-Golgi vers la membrane plasmique via le recrutement et l'activation du facteur d'échange de protéines Rab (SEC2) (Mizuno-Yamasaki et al., 2010). Enfin, le PI(4)P représente un substrat pour la synthèse du PI(4,5)P<sub>2</sub> près de la membrane plasmique (Sohn et al., 2018).

### 3.4.3 PI(3,4,5)P<sub>3</sub>

Le PI(3,4,5)P<sub>3</sub> (ou PIP<sub>3</sub>) est un lipide de signalisation présent en très faible quantité dans la membrane plasmique. Il est produit *in vivo* transitoirement à la suite de signaux extracellulaires par la PI3K de classe I à partir de PI(4,5)P<sub>2</sub>. Le PI(3,4,5)P<sub>3</sub> est capable d'interagir avec une série de kinases, de molécules adaptatrices et de facteurs d'échange pour des protéines G le transformant en un second messager impliqué dans une large gamme de processus cellulaires (prolifération, apoptose, réponse

immunitaire...). En se liant aux domaines homologues de la pleckstrine (PH) d'AKT, le  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$  va jouer le rôle d'effecteur positif sur son activité et sur la cascade de phosphorylation qui en découle (Hirsch et al., 2020). Afin de prévenir l'hyperactivation des récepteurs et l'hyperprolifération des cellules, le  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$  est hydrolysé par une série d'enzymes et où la 3-phosphatase PTEN est certainement l'une des principales grâce à sa capacité à déphosphoryler le carbone en position D-3 du cycle inositol du  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$  et de donner du  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ . Ce rôle suppresseur de tumeur est l'une des fonctions clés de PTEN qui est d'ailleurs impliquée dans un grand nombre de cancer en cas de mutations (Luongo et al., 2019). Certaines enzymes de la famille des 5-phosphatases (SHIP1, SHIP2, SYNJ2, INPP5E, INPPJ, INPP5K) sont théoriquement également capables d'utiliser le  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$  afin de produire du  $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$  (Ramos, Ghosh, & Erneux, 2019). Ce rôle a particulièrement été étudié pour les enzymes de la famille SHIP. En comparaison aux cellules contrôles  $\text{SHIP2}^{+/+}$ , l'absence de SHIP2 dans des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF)  $\text{SHIP2}^{-/-}$  induit après stimulation avec du sérum une augmentation de la concentration en  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$  (Blero et al., 2005). Chez le zebrafish, SHIP1 limite la motilité des neutrophiles et leur recrutement aux niveaux des plaies via son action catalytique sur le  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$  (Lam et al., 2012). Il semblerait néanmoins que ces enzymes ne soient pas impliquées de manière équitable dans la régulation du  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ . L'utilisation de petits ARN interférents (siRNA) contre les phosphatases (PTEN, SHIP1, SHIP2, SYNJ1/2, INPP5E, INPPJ, INPP5K, INPP5B, OCRL1) dans des lignées de cellules épithéliales de glande mammaire (MCF10A) a montré que seuls les siRNA dirigés contre l'acide ribonucléique messenger (ARNm) de PTEN et de SHIP2 induisaient une augmentation de la concentration de  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$  consécutive à une stimulation avec du facteur de croissance épidermique (EGF) (Malek et al., 2017).

En altérant l'activité des enzymes (PIP5K et PI3K classe I), la phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase (PIP4K) serait également un régulateur négatif de la synthèse de  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$  et de la voie de l'insuline (Sharma et al., 2019).

#### 3.4.4 $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$

Le  $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$  est principalement présent sur les vésicules d'endocytoses et dans la membrane plasmique. Le  $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$  a une origine multiple. Une partie de la synthèse totale de  $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$  accompagne la formation de  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$  car il est généré à la suite de la déphosphorylation du  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$  par les 5-phosphatases SYNJ2, INPP5J, SHIP1/2 (Ramos, Ghosh, & Erneux, 2019). Cette régulation permettrait de réduire l'activation de la PI3K de classe I : par exemple, le recrutement de SHIP1 permet aux motifs *Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* (ITIM) des récepteurs FcγRIIB de limiter la signalisation de la PI3K de classe I et par conséquent limiter la réponse antigène-anticorps dans les lymphocytes B et mastocytes (Daëron & Lesourne, 2006). Une autre partie du  $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$  proviendrait de la phosphorylation directe du  $\text{PI}(4)\text{P}$  par la PI3K de classe I ou de classe II (Posor et al., 2013). Enfin, le  $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$  pourrait également être généré à partir de  $\text{PI}(3)\text{P}$  par la phosphorylation de la position D-4 du cycle inositol par une PIP4K de type II (Vanhaesebroeck et al., 2010). Inversement, le  $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$  est

principalement métabolisé par les inositol polyphosphate-4-Phosphatase Type I A (INPP4A) et type I B (INPP4B) afin de former du PI(3)P (Hawkins & Stephens, 2016; Marat et al., 2017).

Une signalisation spécifique au PI(3,4)P<sub>2</sub> a été mise en évidence par l'identification des protéines *Tandem PH domain-containing protein 1 & 2* (TAPP1 et TAPP2). Elles interagissent préférentiellement via leurs domaines PH avec le PI(3,4)P<sub>2</sub>, afin d'agir comme régulateurs négatifs de la voie de signalisation de l'insuline et de la PI3K, menant dans le cadre des lymphocytes B à une réduction de l'activation et la production d'anticorps (Landego et al., 2012; Wullschleger et al., 2011).

Le PI(3,4)P<sub>2</sub> permet le recrutement direct ou indirect de protéines qui coordonnent le réarrangement des filaments d'actine et la déformation de la membrane. Dans les principales voies d'endocytoses, le PI(3,4)P<sub>2</sub> permet de recruter les protéines *Sorting nexine 5 et 9* (SNX5 et SNX9) qui contrôlent la maturation et la scission de la vésicule d'endocytose depuis la membrane plasmique dans le cadre de l'endocytose médiée par la clathrine (CME) et la pinocytose (Lim et al., 2008; Posor et al., 2015). L'endocytose rapide médiée par l'endophiline (FEME) nécessite la production de PI(3,4)P<sub>2</sub> par les phosphatases SHIP1/2 afin de recruter la lamellipodine qui va elle recruter l'endophiline. Cette dernière permet de recruter la dynamine et initier les filaments d'actine nécessaires à la formation de la vésicule d'endocytose (Boucrot et al., 2015; Vehlow et al., 2013).

Le PI(3,4)P<sub>2</sub> intervient également via la lamellipodine en régulant l'organisation des filaments d'actine dans la formation d'invadopodes, de podosomes, de lamellipodes et des renflements membranaires « ruffling » (Bae et al., 2010; Hansen & Mullins, 2015; Yoshinaga et al., 2012). Un lien entre SHIP2, le PI(3,4)P<sub>2</sub> et les invadopodes a par ailleurs été mis en évidence. En étant localisé dans le core de l'invadopode, SHIP2 permet de réguler la quantité de PI(3,4)P<sub>2</sub> produite localement au sein de la structure et maintenir la maturation de l'invadopode (Sharma et al., 2013).

Comme nous venons de le voir, le métabolisme des PI est complexe, car il existe parfois plusieurs voies qui permettent de générer le même PI. Etant donné l'importance des fonctions dans lesquelles les PI sont impliqués, leur synthèse est étroitement régulée afin d'assurer le bon fonctionnement cellulaire. Cette régulation est orchestrée par un ensemble d'enzymes dont certaines ont déjà été brièvement citées précédemment. Dans le cadre de cette introduction, nous focaliserons notre attention sur les enzymes de la famille des inositol polyphosphate 5-phosphatases.

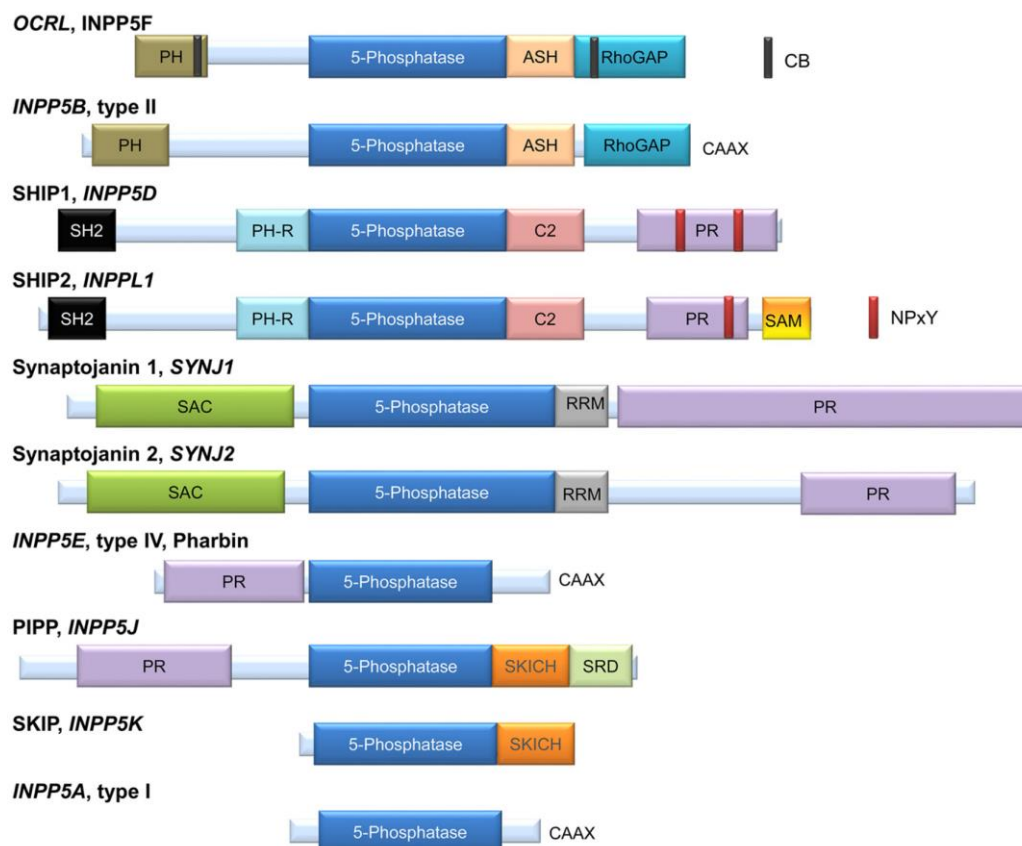
### 3.5 Famille des inositol polyphosphate 5-phosphatases

#### 3.5.1 Généralités

Les inositol polyphosphate 5-phosphatases (également appelés phosphoinositides 5-phosphatases) sont des enzymes capables de déphosphoryler le carbone en position 5 du noyau myo-inositol des inositols phosphates et/ou PI. Dix enzymes différentes font partie de cette famille : OCRL1, INPP5F, INPP5B, SHIP1/2, SYNJ1/2, INPP5E, INPP5J, INPP5K et INPP5A (Blero et al., 2007) (Figure 28). Elles partagent toutes un domaine catalytique central, le domaine 5-phosphatase, capable d'interagir

avec des PI et dont la structure et la composition en acides aminés sont relativement bien conservées (Ramos, Ghosh, & Erneux, 2019).

A l'exception de INPP5A qui déphosphoryle exclusivement les inositol phosphates solubles [l'inositol 1,4,5-trisphosphate (Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>) et l'inositol 1,3,4,5-tétrakisphosphate (Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>)], tous les autres membres de cette famille catalysent essentiellement la déphosphorylation du phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>) en phosphatidylinositol 4 phosphate (PI4P), et du phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate (PI(3,4,5)P<sub>3</sub>) en phosphatidylinositol 3,4 bisphosphate (PI(3,4)P<sub>2</sub>). Par conséquent, ces enzymes exercent un contrôle négatif sur la concentration du PI(3,4,5)P<sub>3</sub> et un contrôle positif sur la production cellulaire du PI(3,4)P<sub>2</sub>. Malgré la similarité d'action du domaine catalytique entre les différentes enzymes, elles semblent tout de même avoir des fonctions spécifiques, non-redondantes dans la cellule, suite probablement à des différences structurales et d'expression tissulaire, cellulaire et subcellulaire (Ramos, Ghosh, & Erneux, 2019) (Tableau 2).



**Figure 28 : Famille des PI 5-phosphatases de mammifères** (Ramos, Ghosh, & Erneux, 2019). OCRL et INPP5B sont très similaires en termes d'organisation interne du domaine. Les deux présentent un domaine PH à l'extrémité N et un domaine ASH suivi d'un domaine RhoGAP à l'extrémité C. OCRL a également deux domaines CB. INPP5B n'a pas les domaines CB et a un domaine CAAX à l'extrémité C. SHIP1 et SHIP2 sont également très similaires en termes d'organisation; les deux contiennent un domaine SH2 à l'extrémité N terminale; un domaine PH-R en amont du domaine catalytique et un domaine C2 en aval de celui-ci. Il y a un domaine PR avec deux motifs de séquence NPxY pour SHIP1 et un pour SHIP2. SHIP2 a également un domaine SAM à l'extrémité C. SYNJ1 et SYNJ2 ont un domaine SAC à l'extrémité N terminale, un domaine RRM à côté du domaine PI 5-phosphatase; et un

domaine PR à l'extrémité C. INPP5E ou pharbin est composé d'un domaine PR à l'extrémité N et d'une séquence CAAX à l'extrémité C. INPP5J/PIPP et INPP5K/SKIP ont en commun un domaine SKICH en aval du domaine 5-phosphatase. INPP5J/PIPP a également un domaine PR à l'extrémité N et un SRD à l'extrémité C. L'INPP5A ou 5-phosphatase de type I est la plus petite de la famille et est constituée, en plus du domaine 5-phosphatase, d'une séquence CAAX à l'extrémité C terminale. ASH, ASPM-SPD2-hydine; CB, liaison à la clathrine; PH-R, lié au PH; PIPP, inositol polyphosphate 5-phosphatase riche en proline; PR, riche en proline; RhoGAP, protéine activant la Rho GTPase; RRM, motif de reconnaissance d'ARN; SAC, domaine phosphatase de type SAC1; SH2, homologie Src 2; Homologie terminale SKICH, SKIP COOH; SRD, domaine riche en sérine. Source : (Ramos, Ghosh, & Erneux, 2019).

### 3.5.2 OCRL1

*Inositol polyphosphate-5-phosphatase oculocerebrorenal syndrome of Lowe protein 1* (OCRL1) est une protéine de 105 kDa dont le gène associé est localisé sur le chromosome humain Xq25. OCRL1 catalyse l'hydrolyse du phosphate présent sur la position 5 du noyau myo-inositol du PI(4,5)P<sub>2</sub> et, dans une moindre mesure, du PI(3,4,5)P<sub>3</sub>, de l'ins(1,4,5)P<sub>3</sub> et de l'ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> (Vicinanza et al., 2011). OCRL1 présente une importante homologie de structure et de séquence avec INPP5B (Jänne et al., 1998).

OCRL1 régule le trafic endosomal par régulation spécifique du pool de PI(4,5)P<sub>2</sub> associé aux endosomes (Staiano et al., 2014; Vicinanza et al., 2011). Il est également impliqué dans l'assemblage du cil primaire et le contrôle de la phagocytose. OCRL1 est largement exprimé dans les tissus. Cette 5-phosphatase est localisée près des structures vésiculaires du système endosomal, de l'appareil de Golgi et à la membrane plasmique (Hakim et al., 2012). OCRL1 est composée d'un domaine *Pleckstrin Homology Domain* (PH) à son extrémité N-terminale, du domaine 5-phosphatase, d'un domaine *abnormal spindle like microencephaly associated protein/spindle pole body 2/hydin* (ASH), et d'un domaine d'homologie RhoGAP à son extrémité C-terminale (Ramos, Ghosh, & Erneux, 2019).

OCRL1 est associée au syndrome de Lowe (syndrome oculocérébro-rénal). En 1992, il fut la première maladie découverte à être associée à une phosphoinositide 5-phosphatase. Il est causé par des mutations inactivatrices du gène OCRL1 présent sur le chromosome X, et est caractérisé par des dysfonctions oculaires (cataracte congénitale), neurologiques (retard mental) et rénales (Attree et al., 1992). OCRL1 est également impliqué dans une autre maladie, la maladie de Dent de type 2, qui est une tubulopathie rénale liée au chromosome X (Hichri et al., 2011). Afin de comprendre la pathologie liée à cette maladie, des études génétiques ont été réalisées chez la souris qui ont mis en évidence une similarité fonctionnelle partielle entre OCRL1 et INPP5B. Cependant, le syndrome de Lowe humain n'a pas pu être reproduit chez la souris lors de l'inactivation spécifique du gène murin correspondant. En effet, alors que les souris OCRL1<sup>-/-</sup> sont asymptomatiques et que les souris INPP5B<sup>-/-</sup> présentent peu d'anomalies (seule une dégénérescence testiculaire post-pubertaire), l'inactivation des deux gènes conduit à une létalité embryonnaire. Ce phénomène s'expliquerait par le fait qu'il existe une compensation fonctionnelle entre



ces deux enzymes (Jänne et al., 1998) et rappelle que malgré les apparences, il existe parfois de grandes différences inter-espèces.

### 3.5.3 INPP5B

*Inositol polyphosphate-5-phosphatase B* (INPP5B) est une 5-phosphatase dont le gène codant est localisé sur le chromosome humain 1p34. Comme la phosphatase OCRL1, elle élimine par hydrolyse les phosphates présents en position D5 sur le noyau myo-inositol des  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ ,  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ ,  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ,  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  et  $\text{Ins}(1,2,4,5)\text{P}_3$ . La structure de la protéine INPP5B est la même que celle de OCRL1, à l'exception de l'extrémité C-terminale où un motif CAAX (cystéine – A (acide aminé aliphatique) – X (résidu quelconque) est présent. Ce motif est impliqué dans sa localisation membranaire d'INPP5B. INPP5B est principalement localisée près de l'appareil de Golgi, dans le cytosol, au niveau de la membrane plasmique et des endosomes. INPP5B est exprimée durant le développement embryonnaire et chez l'adulte. Elle a un rôle redondant avec OCRL1 (Bohdanowicz et al., 2012; Jänne et al., 1998; Ramos et al., 2018).

### 3.5.4 SYNJ1/2

Les synaptojanines 1 et 2 (SYNJ1 et 2) sont deux 5-phosphatases aux structures protéiques très similaires. SYNJ1 est encodée par le gène SYNJ1/INPP5G sur le chromosome 21q22.11, et SYNJ2/INPP5H sur le chromosome 6q25.3. Elles possèdent un domaine SAC à l'extrémité N-terminale, un domaine 5-phosphatase central et une région C-terminale riche en proline (Saito et al., 2001). Le domaine SAC est responsable de la déphosphorylation du  $\text{PI}(3)\text{P}$ ,  $\text{PI}(4)\text{P}$  et  $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$  en  $\text{PI}$ . Le domaine 5-phosphatase est principalement responsable de la déphosphorylation du  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ , mais également du  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ , de l' $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  et de l' $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  (Belle Chang-Ileto et al., 2011).

Chaque isoforme possède ses propres variants d'épissage. Certains variants sont plus fortement exprimés dans les terminaisons nerveuses et d'autres, plus ubiquitaires, seraient recrutés près de la mitochondrie (Mani et al., 2007; Miranda et al., 2018).

Des souris  $\text{SYNJ1}^{-/-}$  ont été générées mais elles meurent majoritairement dans les 24h après la naissance, au plus tard après 15 jours, suite à d'importantes anomalies neurologiques (Cremona et al., 1999).

Chez l'homme, SYNJ1 est potentiellement impliquée dans le syndrome de Down (trisomie du chromosome 21, caractérisée par un retard cognitif accompagné de malformations cardiaques et d'une augmentation de la sensibilité à certains cancers), dans la maladie de Parkinson, d'Alzheimer voire dans la bipolarité (B. Chang-Ileto & Di Paolo, 2009; Miranda et al., 2018). Concernant l'implication de SYNJ2 dans des maladies humaines, peu de choses sont connues. Elle est moins exprimée que SYNJ1 dans les tissus nerveux mais aurait des fonctions similaires (Mani et al., 2007). Elle est potentiellement impliquée dans l'audition chez la souris (Manji et al., 2011).

PI 5-Phosphatase	Substrate(s) Identified on Isolated Enzyme	Intact Cell Substrate(s)
<i>OCRL</i> , <i>INPP5F</i>	PI(3,4,5)P <sub>3</sub> , PI(4,5)P <sub>2</sub> , PI(3,5)P <sub>2</sub> , Ins(1,3,4,5)P <sub>4</sub> , Ins(1,4,5)P <sub>3</sub>	PI(4,5)P <sub>2</sub>
<i>INPP5B</i> , type II	PI(3,4,5)P <sub>3</sub> , PI(4,5)P <sub>2</sub> , Ins(1,3,4,5)P <sub>4</sub> , Ins(1,4,5)P <sub>3</sub>	PI(4,5)P <sub>2</sub>
<i>SHIP1</i> , <i>INPP5D</i>	PI(3,4,5)P <sub>3</sub> , Ins(1,3,4,5)P <sub>4</sub>	PI(3,4,5)P <sub>3</sub>
<i>SHIP2</i> , <i>INPPL1</i>	PI(3,4,5)P <sub>3</sub> , PI(4,5)P <sub>2</sub> , Ins(1,3,4,5)P <sub>4</sub>	PI(3,4,5)P <sub>3</sub> , PI(4,5)P <sub>2</sub>
<i>SYNJ1</i>	PI(4,5)P <sub>2</sub> , PI(3,4,5)P <sub>3</sub>	PI(4,5)P <sub>2</sub> , PI(3,4,5)P <sub>3</sub>
<i>SYNJ2</i>	PI(4,5)P <sub>2</sub> , PI(3,4,5)P <sub>3</sub>	PI(4,5)P <sub>2</sub> , PI(3,4,5)P <sub>3</sub>
<i>INPP5E</i> , type IV, pharbin	PI(4,5)P <sub>2</sub> , PI(3,5)P <sub>2</sub> , PI(3,4,5)P <sub>3</sub>	PI(4,5)P <sub>2</sub> , PI(3,4,5)P <sub>3</sub>
<i>PIPP</i> , <i>INPP5J</i>	PI(3,4,5)P <sub>3</sub> , PI(4,5)P <sub>2</sub> , Ins(1,3,4,5)P <sub>4</sub> , Ins(1,4,5)P <sub>3</sub>	PI(3,4,5)P <sub>3</sub>
<i>SKIP</i> , <i>INPP5K</i>	PI(3,4,5)P <sub>3</sub> , PI(4,5)P <sub>2</sub> , Ins(1,3,4,5)P <sub>4</sub> , Ins(1,4,5)P <sub>3</sub>	PI(3,4,5)P <sub>3</sub> , PI(4,5)P <sub>2</sub>
<i>INPP5A</i> , type I	Ins(1,4,5)P <sub>3</sub> , Ins(1,3,4,5)P <sub>4</sub>	Ins(1,4,5)P <sub>3</sub> , Ins(1,3,4,5)P <sub>4</sub>

**Tableau 2 : Phosphoinositides 5-phosphatases et leurs substrats** (Ramos, Ghosh, & Erneux, 2019). Il est possible que ces substrats varient en fonction du contexte cellulaire. Adapté de (Ramos, Ghosh, & Erneux, 2019).

### 3.5.5 INPP5J/PIPP

Le gène codant pour l'inositol polyphosphate-5-phosphatase J (INPP5J ou *proline rich inositol polyphosphate 5-phosphatase* (PIPP)) est situé sur le chromosome humain 22q12.2. Cette 5-phosphatase est caractérisée par la présence d'une région N-terminale riche en proline, d'un domaine catalytique central, d'un domaine *SKIP carboxyl homology domain* (SKICH) et d'un domaine riche en proline à l'extrémité C-terminale de la protéine. Elle déphosphoryle le PI(4,5)P<sub>2</sub>, le PI(3,4,5)P<sub>3</sub>, l'Ins(1,3,5)P<sub>3</sub> et l'Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> (Ramos, Ghosh, & Erneux, 2019).

Fonctionnellement, cette 5-phosphatase reste encore très mal connue. Des modifications de son expression ont été associées à certains cancers humains comme le mélanome et le cancer du poumon (Ooms et al., 2015; Ye et al., 2013).

### 3.5.6 INPP5K/SKIP

L'Inositol polyphosphate 5-phosphatase K (INPP5K ou *Skeletal muscle and kidney enriched inositol phosphatase* (SKIP)) est une enzyme de 51.1 kDa dont le gène est localisé sur le chromosome 17p13.3. Elle est exprimée de manière ubiquitaire, mais est très abondante dans les muscles, le cœur, le cerveau, les reins, les testicules et les yeux. Plusieurs variants de la protéine ont été mis en évidence,

et la présence et l'abondance de ces variants dépendent de l'espèce et du tissu cible (Pernot et al., 2011). La structure de la protéine INPP5K est relativement simple. Elle est composée du domaine catalytique 5-phosphatase à son extrémité N-terminale et d'un domaine SKITCH à l'extrémité carboxy-terminale. INPP5K déphosphoryle à la fois le  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$  et le  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ , mais à une plus grande affinité pour ce dernier. Aucune activité phosphatase n'a été détectée envers les  $\text{PI}(5)\text{P}$ ,  $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$ ,  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  ou  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  (Schmid et al., 2004). Le domaine SKITCH est dédié aux interactions protéiques et régule la localisation intracellulaire de l'enzyme. Par exemple, à la suite d'une stimulation par des facteurs de croissance, le domaine SKITCH induit la translocation d'INPP5K du réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique. La présence de mutations inactivatrices dans le gène codant pour cette protéine conduit à une forme rare, congénitale de dystrophie musculaire associée à de la cataracte, une petite taille et à un retard mental (Osborn et al., 2017; Wiessner et al., 2017). L'expression de l'ARNm codant pour INPP5K est parfois augmentée ou diminuée dans certains types de cancers spécifiques. En effet, le gène INPP5K fait fréquemment l'objet de mutations inactivatrices dans certains cancers comme le carcinome de l'endomètre. (Ijuin, 2019; Ramos, Ghosh, & Erneux, 2019). Chez la souris, l'inactivation des deux allèles du gène INPP5K conduit à une létalité embryonnaire à E10. Les souris hétérozygotes sont viables mais présentent des anomalies, comme une augmentation de la masse musculaire, une hypersensibilité à l'insuline et une phosphorylation accrue de PKB/AKT (Ijuin et al., 2008). Les souris transgéniques surexprimant INPP5K de manière ubiquitaire sont viables mais présentent une excrétion urinaire retardée à la prise de boisson et une diminution de l'osmolalité plasmatique à son niveau basal (Pernot et al., 2011).

### 3.5.7 INPP5E

L'inositol polyphosphate-5-phosphatase E (INPP5E ou Pharbin) est une enzyme de 72 kDa dont le gène correspondant est localisé sur le chromosome humain 9q34.3. Elle est composée d'une région riche en proline, du domaine catalytique 5-phosphatase et d'un motif CAAX dans sa région C-terminale. D'expression ubiquitaire, on la retrouve majoritairement dans le cerveau, le cœur et les testicules. Dans la cellule, elle se localise au niveau de la membrane plasmique et de l'appareil de Golgi, mais principalement au niveau du cil primaire (Ramos, Ghosh, & Erneux, 2019). INPP5E est capable de déphosphoryler le  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ , et dans une moindre mesure le  $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$  et le  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ . A la différence des autres 5-phosphatases, elle ne possède pas d'activité à l'encontre des inositol phosphates solubles (Hardee et al., 2017; Jacoby et al., 2009).

Chez la souris, l'inactivation d'INPP5E est à l'origine d'une ciliopathie responsable d'importantes anomalies (anophtalmie, polydactylie, reins polykystiques, exencéphalie, anomalies du squelette) se traduisant par la mort embryonnaire ou périnatale des nouveaux-nés (Jacoby et al., 2009).

Chez l'homme, INPP5E est impliquée dans des ciliopathies comme les syndromes de Joubert et MORM. Le syndrome de Joubert est caractérisé par une malformation congénitale du tronc cérébral et une agénésie/hypoplasie cérébelleuse entraînant des troubles respiratoires, du développement moteur et une

ataxie. Le syndrome de MORM se caractérise par un retard mental, une obésité du tronc, une dystrophie rétinienne et un micropenis (Bielas et al., 2009; Hardee et al., 2017; Jacoby et al., 2009).

### 3.5.8 SHIP1/2

#### A. SHIP1

*Src homology 2 (SH2) domain-containing inositol 5-phosphatase 1* ou phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 1 (SHIP1) est une enzyme exprimée majoritairement dans le système hématopoïétique et dans les cellules spermatogéniques. Sa structure est composée d'un domaine SH2 à son extrémité N-terminale, suivi du domaine catalytique 5-phosphatase, d'un domaine C2, d'une région riche en proline et de tyrosines dans des motifs NPXY. Elle est capable de déphosphoryler le  $PI(3,4,5)P_3$  et le  $PI(4,5)P_2$  en  $PI(3,4)P_2$  et  $PI(4)P$ , respectivement. A la suite d'épissages alternatifs, quatre isoformes de SHIP1 sont potentiellement générées : SHIP1 $\alpha$ , SHIP1 $\beta$ , SHIP1 $\delta$  et s-SHIP1. SHIP1 est une enzyme régulatrice clé de l'axe PI3K/AKT par sa capacité à hydrolyser le  $PI(3,4,5)P_3$ .

La déficience en SHIP1 induit une accumulation de  $PI(3,4,5)P_3$ , provoquant une réponse hyperproliférative à une série de facteurs de croissance via la voie PI3/AKT et affectant les cellules et organes du système hématopoïétique (lymphocytes B et T, macrophages, ostéoclastes, plaquettes,...) (Balla, 2013). Les souris SHIP1<sup>-/-</sup> présentent une activation d'AKT augmentée dans les neutrophiles et les mastocytes. Elles meurent prématurément après avoir développé une pseudoleucémie myéloïde chronique avec prolifération myéloïde dans les poumons et une splénomégalie (Helgason et al., 1998; Liu et al., 1999). Ces souris présentent également une perte osseuse sévère consécutive à une hyperactivation des ostéoclastes, un déficit d'agrégation plaquettaire et une augmentation du nombre de cellules dendritiques spléniques (Antignano et al., 2010; Artemenko et al., 2009; Takeshita et al., 2002). Récemment, des chercheurs ont montrés que SHIP1 était impliquée dans la régulation de l'ossification endochondrale par son expression dans les ostéochondroprogéniteurs. En l'absence de SHIP1, les souris présentent un retard de croissance, une hypertrophie accélérée des chondrocytes avec fermeture prématurée des centres d'ossification secondaires de la plaque de croissance. Ces souris présentent également une augmentation de la vascularisation de la moelle osseuse. Il a été observé qu'en réponse à l'hypoxie, les cellules souches mésenchymateuses SHIP1<sup>-/-</sup> présentent une activation diminuée d'AKT et *Extracellular signal-regulated kinase 1 and 2* (ERK) comparé aux cellules contrôles (So et al., 2020).

## B. SHIP2

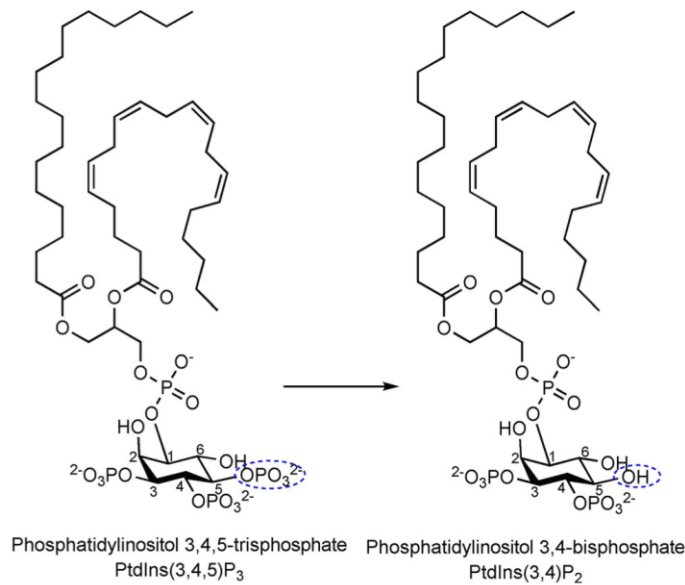
### 1) Structure

*SH2 domain-containing inositol 5-phosphatase 2* ou phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 2 (SHIP2) est encodée par le gène INPPL1 qui est situé chez l'homme sur le chromosome 11q23 (Pesesse et al., 1997). La séquence de la protéine chez la souris ou le rat est similaire à 96% à celle de l'homme (Ishihara et al., 1999; Schurmans et al., 1999).

Bien qu'il existe 2 isoformes générées par épissage alternatif (une isoforme longue de 1258 acides aminés et une isoforme courte de 1016 résidus dont les résidus 1-242 sont manquants), de nombreux mutants de la protéine ont été répertoriés chez l'homme comme énoncé précédemment. La protéine SHIP2 a un poids moléculaire de 155-kDa et est structurée en plusieurs domaines dont l'agencement est proche de ceux de SHIP1 : un domaine SH2 à l'extrémité N-terminale (manquant chez l'isoforme courte de la protéine), un domaine catalytique 5-phosphatase, un domaine C2, des régions riches en proline (motifs PxxP), des sites de phosphorylation sur tyrosine (motifs NPXY) et un domaine *Sterile alpha motif* (SAM) à son extrémité C-terminale (Wisniewski et al., 1999).

Le substrat principal de SHIP2 est le PI(3,4,5)P<sub>3</sub> dont elle déphosphoryle le carbone en position D-5 du cycle myo-inositol en PI(3,4)P<sub>2</sub> (Giuriato et al., 2002) (Figure 29). Ce produit de réaction est capable d'interagir avec les domaines PH de certaines protéines (comme TAPP1) et est impliqué dans plusieurs processus physiologiques importants, comme l'endocytose, la formation des lamellipodes, la maturation des invadopodes. (Krause & Gautreau, 2014; Sharma et al., 2013)

Plusieurs groupes de chercheurs ont également montré que le PI(4,5)P<sub>2</sub> est aussi un substrat de SHIP2, le transformant en PI(4)P après déphosphorylation (Elong Edimo et al., 2016a; Giuriato et al., 2002; Nakatsu et al., 2010a). Sans être sûr que ces réactions se produisent également *in vivo*, il a été rapporté qu'*in vitro*, SHIP2 est capable de déphosphoryler l'ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> (Pesesse et al., 1998), l'Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub>, l'Ins(2,4,5,6)P<sub>4</sub>, l'Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub> et le DIC<sub>4</sub>PI(3,5)P<sub>2</sub> (Chi et al., 2004; Thomas et al., 2017).



**Figure 29 : Réaction catalysée par SHIP2** (Thomas et al., 2017). SHIP2 catalyse la déphosphorylation du  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$  en  $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$ . Le site de la réaction est identifié par des pointillés bleus.

Le domaine SH2 de SHIP2 a la capacité d'interagir avec des protéines contenant des domaines à phosphotyrosines, comme les protéines adaptatrices P130CAS, l'immunorecepteur  $\text{Fc}\gamma\text{RIIb}$  ou le récepteur tyrosine kinase MET (c-MET) (Bruhns et al., 2000; Koch et al., 2005; Prasad et al., 2001). Les tyrosines situées dans le motif NPXY de la portion C-terminale de SHIP2 offrent des sites de liaison aux protéines contenant des domaines *Phosphotyrosine binding* (PTB) et SH2. La tyrosine Y986 du motif NPXY fait notamment office de site de phosphorylation (Blero et al., 2001; Thomas et al., n.d.). La région terminale riche en proline facilite la liaison de kinases, protéines adaptatrices et récepteurs membranaires contenant des motifs ITIM ou *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM). Le domaine C2 serait impliqué dans la liaison avec le calcium ou les lipides (Thomas et al., 2017). Le domaine C-terminal SAM est un domaine d'interaction protéique capable de se dimériser et d'interagir avec le récepteur EPH receptor A2 (EPHA2), ce qui confère à la protéine SHIP2 des propriétés oncogéniques (Mercurio et al., 2017; Thomas et al., 2017). Le tableau 3 regroupe l'ensemble des interactions protéiques répertoriées pour SHIP2.

SHIP2 protein interactors	Method used for identification
Receptors	
EGF	co-immunoprecipitation [Pesesse et al., 2001]
PDGF	co-immunoprecipitation [Taylor et al., 2000]
FcγRIIb (ITIM)	co-immunoprecipitation [Muraille et al., 2000]
FcγRIIA (ITAM)	co-immunoprecipitation [Pengal et al., 2003]
CSF	mass spec [Wisniewski et al., 1999]
cMET	yeast two hybrid [Koch et al., 2005]
Abl	mass spec [Brehme et al., 2009]
Ephrin A2	yeast two hybrid [Zhuang et al., 2006]
Adaptors/regulators	
Shc	co-immunoprecipitation [Habib et al., 1998]
p130 <sup>Cas</sup>	co-immunoprecipitation [Prasad et al., 2001]
p85α	mass spec [Brehme et al., 2009]
AP5	yeast two hybrid [Onnockx et al., 2008]
DOK1	mass spec [Cunningham et al., 2010]
JIP1	yeast two hybrid [Xie et al., 2008a]
Cytoskeletal proteins and/or regulators of endocytosis	
c-Cbl	yeast two hybrid [Vandenbroere et al., 2003]
vinexin	yeast two hybrid [Paternotte et al., 2005]
filamin	yeast two hybrid [Dyson et al., 2001]
intersectin 1	yeast two hybrid [Xie et al., 2008b]
ARAP-3	yeast two hybrid [Raaijmakers et al., 2007]
CIN-85	mass spec [Havrylov et al., 2009]
Protein phosphatases and subunits	
PTP1B	mass spec [Mertins et al., 2008]
PR130	mass spec [Zwaenepoel et al., 2010]

**Tableau 3 : Protéines interagissant avec SHIP2** (Erneux et al., 2011).

## 2) Modifications post-traductionnelles

La protéine SHIP2 présente plusieurs sites potentiels de phosphorylation sur des résidus sérines, tyrosines et thréonines (S132, T165, S241, T958, Y986, Y1135, Y1162, T1254, S1258) (Artemenko et al., 2007; Deneubourg et al., 2014; Dephore et al., 2008; Elong Edimo et al., 2011, 2012; Olsen et al., 2006; Pesesse et al., 2001; Steen et al., 2002). Huit sites de phosphorylation ont été identifiés dans des cellules COS-7 surexprimant SHIP2, 3 dans des astrocytomes humains avec un niveau endogène de SHIP2 (Elong Edimo et al., 2012). Bien que tous n'ayant pas encore été confirmés, ceux-ci seraient impliqués dans les interactions avec d'autres protéines, dans la modulation de l'activité de la fonction catalytique et dans la signalisation des PI.

La première preuve de phosphorylation de SHIP2 sur sérine/thréonine a été identifiée dans des préadipocytes 3T3-L1 stimulés avec du *Platelet-derived growth factor* (PDGF) et surexprimant SHIP2. Cette stimulation induit la phosphorylation de SHIP2 sur T958, diminuant la phosphorylation de SHIP2 sur tyrosine et sa capacité d'interaction avec d'autres protéines adaptatrices comme *Src homology 2 domain containing transforming protein 1* (SHC) (Artemenko et al., 2007; Elong Edimo et al., 2012). La phosphorylation de SHIP2 sur S132 jouerait un rôle dans la régulation de la localisation de SHIP2 et sur sa stabilité. Lorsque phosphorylé sur S132, SHIP2 se concentre près des granules nucléaires (speckles), ce qui pourrait moduler le pool de PI(4,5)P<sub>2</sub> nucléaire et avoir un impact sur l'expression de

gènes en ayant un contrôle sélectif des ARNm via la régulation d'une polymérase poly(A) (Elong Edimo et al., 2011; Mellman et al., 2008).

Ces modifications post-traductionnelles seraient dépendantes du type de stimulation. Ce phénomène a notamment été montré dans des cellules COS-7 surexprimant SHIP2 et marquées à l'isotope  $^{32}\text{P}$ , et où la stimulation avec EGF provoque une phosphorylation sur tyrosine de manière plus intense qu'une stimulation par l'insuline (Elong Edimo et al., 2011).

SHIP2 peut également être le site d'ubiquitination ce qui pourrait influencer sa stabilité protéique. Lorsque des cellules COS-7 sont stimulées avec du EGF, SHIP2 est ubiquitinisé sur K315, conjointement à la perte d'interaction entre le domaine SH2 de SHIP2 et la protéine c-CBL (De Schutter et al., 2009). Plus récemment, lorsque *S-phase kinase-associated protein 2* (SKP2), un composant du complexe de l'E3-ubiquitine-ligase, est augmenté dans des cellules de carcinome hépatocellulaire (HCC) surexprimant la protéine *Hepatitis B virus x protein* (HBx), on observe une augmentation de la polyubiquitination de SHIP2 conjointement à une diminution de son expression protéique sans diminution de son taux d'ARNm (Su & Yu, 2019).

### 3) Localisation

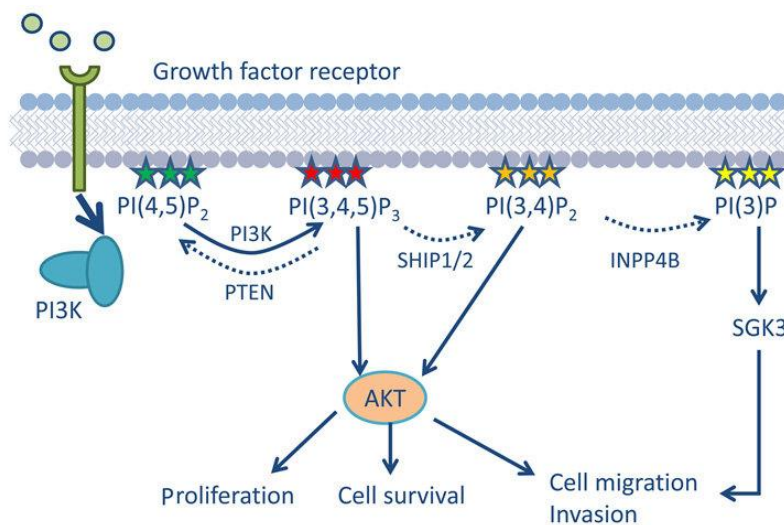
La protéine SHIP2 est exprimée de manière ubiquitaire durant la vie embryonnaire et adulte (Muraille et al., 2001; Schurmans et al., 1999). En effet, chez la souris, l'ARNm de SHIP2 a été retrouvé dans tous les tissus analysés, dont le cartilage (Schurmans et al., 1999). L'utilisation du gène rapporteur LacZ chez des souris INPPL1<sup>-/-</sup> a permis de mettre en évidence une très forte expression dans le cerveau, les muscles et le cœur, et une plus faible expression dans les poumons, le rein et le foie (Sleeman et al., 2005). Les fonctions physiologiques de SHIP2 seraient modulées en fonction de sa location intracellulaire. Par exemple, SHIP2 aurait préférentiellement comme substrat le PI(3,4,5)P<sub>3</sub> lorsque présente au niveau de la membrane plasmique, et le PI(4,5)P<sub>2</sub> lorsque présente dans le noyau près granules nucléaires (speckles) (Elong Edimo et al., 2011). SHIP2 est cependant majoritairement cytoplasmique. Comme évoqué précédemment, des modifications post-traductionnelles peuvent influencer sa localisation. A la suite de la stimulation par divers stimuli, elle est déplacée vers la membrane plasmique ou vers les points focaux d'adhérence grâce à ces différents domaines. En effet, les interactions protéiques faisant intervenir le domaine SH2 permet à SHIP2 de se connecter à des voies de signalisation spécifiques et de relocaliser l'enzyme dans le compartiment cellulaire adéquat, mettant en évidence d'autres fonctions de la protéine (Wang et al., 2018). Par exemple, SHIP2 a une localisation périnucléaire dans les cellules HeLa maintenues dans du sérum. En présence d'EGF, une fraction du pool de SHIP2 est déplacée vers la membrane plasmique (Deneubourg et al., 2010). La présence de SHIP2 a également été identifiée au niveau du noyau cellulaire, principalement près granules nucléaires des astrocytomes 1321 N1 et des cellules musculaires lisses vasculaires de porc (Délérès et al., 2003; Elong Edimo et al., 2011).



#### 4) Fonctions

##### a. *SHIP2 dans la voie de signalisation de l'insuline*

Les premiers travaux sur SHIP2 l'ont impliquée dans la voie de signalisation de l'insuline. En effet, via sa fonction catalytique (qui déphosphoryle le  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$  en  $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$ ) (Figure 30), SHIP2 affecte négativement l'activation de la PKB/AKT et la voie des MAPK, réduisant la synthèse de glycogène, la translocation du transporteur de glucose *Glucose transporter type 4* (GLUT4) à la membrane plasmique et l'absorption du glucose par la cellule (Blero et al., 2001; Ishihara et al., 1999; Sasaoka et al., 2003; Wada et al., 2001). Il a été montré que la présence de mutations affectant le gène *INPPL1* augmente notamment la susceptibilité au diabète de type 2 chez le rat et l'homme (Kagawa et al., 2005; Marion et al., 2002). Chez la souris, l'absence de SHIP2 procure une résistance à l'obésité (Sleeman et al., 2005), alors que la surexpression de SHIP2 altère leurs performances cognitives, réduit les effets neuroprotecteurs de l'insuline dans le cerveau, module la sensibilité à l'insuline et l'expression des enzymes hépatiques phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) et glucose-6-phosphatase (G6Pase) (Accardi et al., 2014; Fukui et al., 2005; Grempler et al., 2007; Soeda et al., 2010). Les souris diabétiques expriment par ailleurs plus de protéine SHIP2 dans leur cerveau que les non diabétiques. Les effets délétaires liés à cette augmentation peuvent être réduits dans un modèle de souris transgéniques exprimant une protéine SHIP2 catalytiquement inactive (Soeda et al., 2010).



**Figure 30 : Régulation de la signalisation PI3K/AKT par les phosphatases** (Chew et al., 2016). Des facteurs de croissance entraînent l'activation de la PI3K qui induit la formation de  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ . Celui-ci peut être déphosphorylé par SHIP2 et former du  $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$ . A la fois le  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$  et le  $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$  sont nécessaires pour l'activation d'AKT. Source : (Chew et al., 2016).

Chez le rat soumis à un régime riche en graisse, l'administration d'un ARN anti-sens ciblant spécifiquement SHIP2 améliore la sensibilité des muscles à l'insuline (Buettner et al., 2007). Toujours chez le rat, des mutations dans le gène SHIP2 ont été identifiées dans la lignée d'individus diabétiques et hypertendus Goto-Kakizaki. L'une d'entre elles située dans le domaine riche en proline (R1142C) induit la diminution de la phosphorylation de la PKB/AKT et des MAPK *in vitro* (Marion et al., 2002). Chez l'homme, plusieurs études se sont intéressées à l'association entre le diabète de type 2 et SHIP2. Il en ressort que différents polymorphismes affectant les portions 5' ou 3' non traduites du gène *INPPL1*

sont associés au diabète de type 2 dans plusieurs cohortes de patients. Un autre polymorphisme situé dans le domaine 5-phosphatase de SHIP2 serait capable de moduler l'activité de la protéine et de protéger d'une insulino-résistance (Kagawa et al., 2005). SHIP2 serait par conséquent une cible thérapeutique à investiguer pour le traitement de cette maladie (Ishida et al., 2006; Kaisaki et al., 2004; Marion et al., 2002).

#### *b. SHIP2 et le cytosquelette*

La protéine SHIP2 est également impliquée dans différents processus cellulaires contrôlant le cytosquelette comme l'endocytose, l'adhésion cellulaire, la prolifération et l'apoptose. Ces fonctions s'exécutent notamment via l'interaction avec d'autres partenaires protéiques.

La direction que peuvent prendre les effets de SHIP2 dans ces processus cellulaires est fortement dépendante du type cellulaire dont il est question. Par exemple, dans le cadre du cancer de l'estomac où l'expression de SHIP2 est généralement diminuée, la surexpression de SHIP2 induit l'apoptose, inhibe la prolifération cellulaire et supprime la motilité cellulaire et l'invasion (Ye et al., 2016). A l'inverse, une diminution de l'apoptose est observée dans des cellules de myélome multiple ou de cancer du poumon (déficiente en SHIP1) traitées avec un inhibiteur total de SHIP1/2 (Fuhler et al., 2012).

L'effet de SHIP2 sur l'adhésion et la prolifération cellulaire nécessite l'interaction avec la protéine adaptatrice p130CAS qui jouerait le rôle de médiateur entre le domaine SH2 de la forme phosphorylée de SHIP2 et l'organisation du cytosquelette d'actine (Prasad et al., 2001). Des cellules HeLa exprimant un mutant de R47G du domaine SH2 de SHIP2 présentent une adhésion cellulaire fortement réduite par rapport aux cellules exprimant la protéine sauvage. Cet effet a également été observé avec une protéine SHIP2 catalytiquement inactive. Ces effets de SHIP2 dépendent notamment de sa phosphorylation sur tyrosine par la kinase SRC (McKinley et al., 2013; Prasad et al., 2002).

Via sa partie C-terminale, SHIP2 interagit avec la vinexine, protéine impliquée dans la prolifération cellulaire et l'organisation du cytosquelette. Leur interaction permet de relocaliser SHIP2 en périphérie de la cellule, ce qui favorise l'adhésion cellulaire (Vandenbroere et al., 2003).

Dans les cellules COS-7, SHIP2 s'associe par sa région riche en proline avec la protéine Intersectin-1, ce qui a pour conséquence de concentrer SHIP2 près des vésicules d'endocytose en formation. On observe que la durée de vie de ces vésicules d'endocytose est raccourcie si l'expression de SHIP2 est réduite, ou que la synthèse des substrats de SHIP2 est augmentée (Nakatsu et al., 2010b). Dans un modèle de cellules N1 de glioblastome, la régulation du PI(4,5)P<sub>2</sub> et du PI(4)P par SHIP2 permet de contrôler la migration cellulaire via l'organisation d'adhésion focale (Ramos et al., 2018). SHIP2 interagit également avec la filamine, une protéine impliquée dans l'organisation du cytosquelette. Leur

interaction permet de concentrer SHIP2 près des renflements membranaires (ruffling) et d'y réguler l'actine sous-membranaire via le PI(3,4,5)P<sub>3</sub> et la PI3K (Dyson et al., 2001).

La formation de lamellipode est associée à la présence d'un complexe protéique qui inclut SHIP2, la lamellipodine et la filamine. SHIP2 intervient également dans la synthèse du PI(3,4)P<sub>2</sub> qui est un ligand spécifique de la lamellipodine (Krause & Gautreau, 2014; Venkatareddy et al., 2011).

SHIP2 se lie au récepteur HGF (c-MET) qui stimule la prolifération cellulaire. En présence d'un mutant catalytiquement inactif de SHIP2, ce phénomène est aboli (Koch et al., 2005).

Les invadopodes sont des protrusions de la membrane plasmique riches en actine en direction de la matrice extracellulaire. Elles seraient impliquées dans certains processus tumoraux. La formation d'invadopodes est associée à l'augmentation de l'activité de la PI3K et de SHIP2 ayant pour conséquence une augmentation de la concentration de PI(3,4)P<sub>2</sub>. SHIP2 régule leur maturation en s'associant avec le complexe d'initiation composé de l'actine, la N-WASP, la cortactine et la cofiline (Hoshino et al., 2012; Sharma et al., 2013).

SHIP2 intervient également dans l'expansion et la migration cellulaire via l'interaction avec la protéine RhoA. Dans les cellules MDCK exprimant la protéine core du virus de l'hépatite C, la surexpression de SHIP2 permet de rétablir la polarité cellulaire et l'activité de RhoA (Awad et al., 2013). Le domaine SAM situé à l'extrémité carboxy-terminale de SHIP2 permet d'établir une interaction hétérodimérique avec ARAP3 qui module le remodelage du cytosquelette d'actine (Raaijmakers et al., 2007). En augmentant la concentration de PI(3,4)P<sub>2</sub>, SHIP2 permet d'accélérer la dégradation de la protéine ARAP3, provoquant une hyperactivation de RhoA et favorisant la neurodégénérescence liée à la maladie d'Alzheimer (Lee et al., 2019).

La déplétion de SHIP2 dans les cellules PC12 stimulées par le facteur de croissance nerveuse (NGF) induit une augmentation du nombre et de la longueur des neurites (Aoki et al., 2007).

Dans les adipocytes 3T3-L1, la stimulation par le PDGF phosphoryle SHIP2 sur tyrosine T958 ce qui améliore son interaction avec SHC et augmente la prolifération cellulaire. L'expression d'un mutant catalytiquement inactif de SHIP2 conduit à l'effet inverse : une accumulation de PI(3,4,5)P<sub>3</sub> est observée, provoquant la dégradation du récepteur PDGF (Artemenko et al., 2007, 2009).

L'absence d'activité catalytique de SHIP2 dans les tubes proximaux rénaux induit une augmentation de la densité de microvillosités et de la réabsorption en solutés (Sayyed et al. 2017).

Plusieurs travaux ont mis en évidence des fonctions pro- ou anti-tumorales de SHIP2 chez l'homme et dans des modèles murins. Par exemple, l'interaction de SHIP2 avec *IQ motif containing GTPase activating protein 2* (IQGAP2) via son domaine SAM, conduit à une augmentation de son activité 5-phosphatase, ce qui inhibe la migration et l'invasion de cellules gastriques cancéreuses (Xu et al., 2020). L'expression de la protéine SHIP2 est augmentée dans les échantillons de carcinomes laryngés à cellules squameuses, de carcinomes hépatocellulaires, de cancers bronchiques non à petites cellules (NSCLC),

de cellules de cancer colorectal et de cancer du sein. Dans ces contextes, SHIP2 pourrait devenir un outil diagnostique et une cible thérapeutique car son expression a été corrélée positivement avec la gravité de la maladie (stade métastatique, survie...) (Fu et al., 2014; Fu, Fan, et al., 2013; Fu, Gu, et al., 2013; Yang et al., 2014; X. Zhou et al., 2011). Mais cette association/corrélation est parfois inversée. Par exemple, une corrélation négative entre l'expression protéique de SHIP2 et de l'agressivité du processus néoplasique est rapportée dans le cadre du carcinome papillaire thyroïdien (Zhou et al., 2018).

Dans les cellules HeLa et les cellules cancéreuses MDA-MB-231, il a été montré que l'ubiquitination de SHIP2 sur K315 empêche la liaison de son domaine SH2 avec c-Cbl, liaison qui a normalement pour fonction de maintenir l'activation du récepteur EGF en masquant le site d'ubiquitination du récepteur destiné à cibler sa dégradation par le protéasome. La réduction de l'expression de SHIP2 par ARN interférent accroît la dégradation du récepteur à l'EGF, ce qui diminue *in vitro* la prolifération cellulaire. Cette diminution de l'expression de EGF diminue la phosphorylation d'AKT et l'expression du récepteur CXCR4 impliqué dans le développement de métastases (Prasad, 2009; Prasad et al., 2008). De la même manière, la sous-unité PR130 de la protéine phosphatase A2 (PPA2) est capable de se lier à SHIP2, ce qui prévient la dégradation du récepteur EGF (Zwaenepoel et al., 2010).

### c. SHIP2 et le système immunitaire

SHIP2 interagit avec deux types de récepteurs de faible affinité pour les immunoglobulines G (FcγR) qui possèdent des motifs ITIM et ITAM : ITAM-containing FcγRIIa et ITIM-containing FcγRIIb. Ces deux récepteurs sont notamment présents sur les monocytes et les macrophages. Lorsque des ligands se fixent sur les récepteurs FcγRIIa, leurs motifs ITAM sont phosphorylés, conduisant à l'activation des voies de signalisation menant à la phagocytose. Il a été montré que SHIP2 inhibe la réponse proliférative découlant de l'activation du récepteur FcγRIIb (Fong et al., 2000). Dans un modèle murin de maladie d'Alzheimer, l'inhibition de la protéine SHIP2 permet de réduire le trouble de mémoire associé à cette pathologie (Kam et al., 2016).

En interagissant avec la protéine d'adhésion aux cellules vasculaires 1 (VCAM-1) impliquée dans l'adhésion leucocytes-cellules endothéliales, SHIP2 serait impliquée dans la reconnaissance immunitaire et l'interaction cellulaire (Byron et al., 2012).

Chez le poisson zèbre, SHIP2 limite l'activité et le recrutement des neutrophiles en modulant leur motilité *via* la régulation de la concentration en PI(3,4,5)P3 (Lam et al., 2012).

SHIP2 régule négativement la tyrosine kinase TEC impliquée dans la liaison antigène-récepteur aux antigènes des lymphocytes T (TCR) (Tomlinson et al., 2004). SHIP2 interagit également avec la tyrosine kinase *Discoidin domain receptor 1* (DDR1) impliquée dans l'adhésion, la migration, la survie et la prolifération cellulaire (Wang et al., 2006).

## 4 LA SOURIS SHIP2<sup>Δ/Δ</sup>

### 4.1 Origine

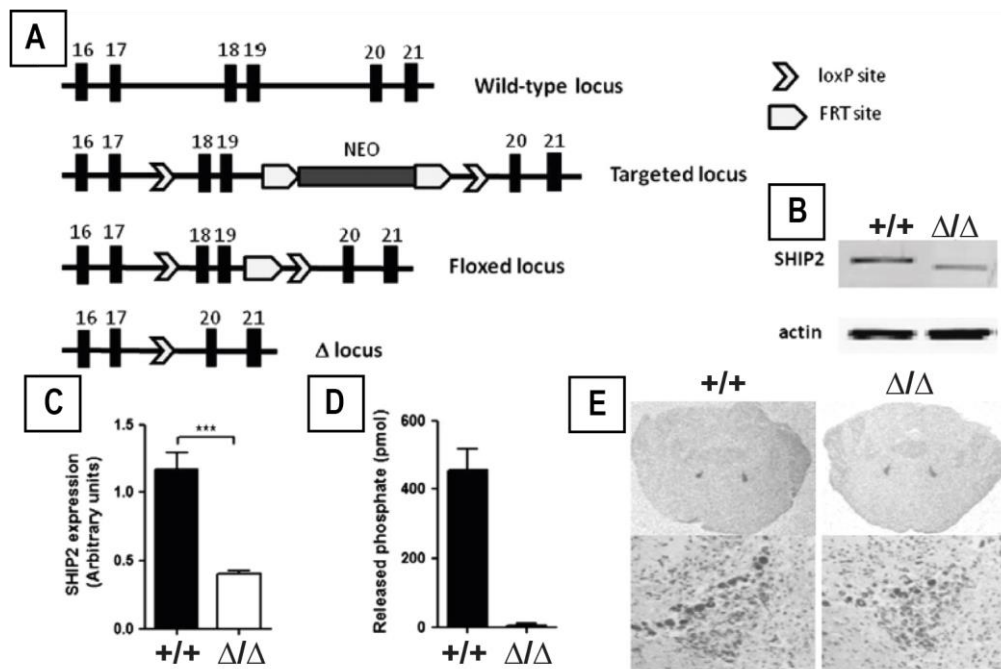
Afin d'étudier le rôle de SHIP2 *in vivo* chez la souris, plusieurs groupes ont construit des souris génétiquement modifiées présentant une diminution ou une absence d'expression de l'enzyme SHIP2. En 2005, Sleeman a généré une souris déficiente pour *Inpp1l* chez laquelle les 18 premiers exons du gène ont été supprimés. Bien que les exons 19 à 28 soient intacts, cette souris ne produit aucun ARNm ni protéine SHIP2. Cette souris SHIP2<sup>-/-</sup> est viable, présente un retard de croissance corporel d'environ 15-20% par rapport à la souris contrôle, ainsi que des anomalies de développement et de forme du crâne (museau raccourci). Ces anomalies apparaissent vers 3-4 semaines, au moment du sevrage. La souris SHIP2<sup>-/-</sup> est résistante à la prise de poids lorsque soumise à un régime riche en graisse et présente également des concentrations sanguines plus élevées en cholestérol et triglycérides (Sleeman et al., 2005).

Pour la réalisation de ce travail, nous avons utilisé une autre souris disponible dans le laboratoire hôte, la souris SHIP2<sup>Δ/Δ</sup> construite par Dubois en 2012. Comme pour beaucoup de souris génétiquement modifiées, cette souris a été construite sur base du système de recombinaison Cre-Lox qui permet d'induire une inactivation partielle ou totale du gène d'intérêt dans un type cellulaire spécifique et/ou contrôlée dans le temps par l'expérimentateur. Ce système comporte une enzyme dérivée du bactériophage P1, la recombinase Cre, qui va recombiner le matériel génétique encadré par de courtes séquences LoxP, également nommées « flox » (contraction de « *Flanked by LoxP sites* » = encadré par des séquences LoxP). Cette méthode permet de réaliser des délétions, translocations, inversions ou insertions dans l'ADN à des sites choisis par l'expérimentateur. Il est dès lors possible d'activer, réprimer ou d'échanger des fragments de gène. L'expression de la recombinase Cre peut être contrôlée afin de restreindre son action dans un type cellulaire spécifique, ou d'être exprimée par un stimulus externe comme un agent chimique ou un choc thermique.

La souris SHIP2<sup>Δ/Δ</sup> a été générée à la suite du croisement entre une souris SHIP2<sup>flox(18+19)/flox(18+19)</sup> avec une souris PGK-Cre (phosphoglycérate kinase (PGK) ).

Chez la souris SHIP2<sup>flox(18+19)/flox(18+19)</sup> (que nous simplifierons « souris SHIP2<sup>flox/flox</sup> »), les exons 18 et 19 du gène *Inpp1l* sont encadrés par des séquences LoxP. Ces exons sont situés dans une région essentielle du domaine catalytique de l'enzyme SHIP2 et représentent par conséquent la cible de la recombinase Cre (Wada et al., 2001) (Figure 31A). En croisant cette souris avec une souris exprimant une recombinase Cre sous la dépendance d'un promoteur fort et ubiquitaire dès les premiers stades du développement embryonnaire (PGK-Cre), le groupe de Dubois a obtenu une souris exprimant une protéine SHIP2 tronquée de 57 acides aminés, la protéine SHIP2 Δ. Alors que la protéine sauvage comptabilise 1257 acides aminés, la protéine tronquée ne compte en effet que 1200 acides aminés

(Dubois et al., 2012). Ce sont ces souris à l'état homozygote, les souris SHIP2<sup>Δ/Δ</sup>, qui ont fait l'objet des analyses dans ce travail.



**Figure 31. Génération de la souris SHIP2<sup>Δ/Δ</sup> mutante catalytiquement inactive** (Dubois et al., 2012). **A.** Représentation du locus sauvage de SHIP2, du locus ciblé, du locus floxé et du locus Δ. Les barres verticales noires sont les exons, NEO est la cassette de résistance à la néomycine et les flèches blanches les sites loxP. **B.** Analyse par Western Blot d'extraits protéiques de tissu périgénital avec un anticorps anti-SHIP2 : signaux détectés à 160kDa (SHIP2<sup>+/+</sup>), 153kDa (SHIP2<sup>Δ/Δ</sup>). L'actine a été utilisée comme contrôle de charge. **C.** Quantification de Western Blot de souris sauvage SHIP2<sup>+/+</sup> et de souris mutante SHIP2<sup>Δ/Δ</sup>. Les résultats révèlent que la souris mutante exprime une protéine SHIP2 qui a un taux d'expression diminué de 65% par rapport à la protéine sauvage. Moyenne  $\pm$  SEM de 8 expériences indépendantes. **D.** La protéine tronquée détectée dans les souris SHIP2<sup>Δ/Δ</sup> est catalytiquement inactive : Immunoprécipitation de SHIP2 depuis du lysat de cœur total incubé avec du PI(3,4,5)P3. La libération de phosphate (en pmol) a été quantifiée. Moyenne  $\pm$  SEM de triplicats d'une expérience représentative. **E.** *In situ* hybridation du cerveau de souris SHIP2<sup>+/+</sup> et SHIP2<sup>Δ/Δ</sup> marqué avec une sonde tyrosine hydroxylase : les points noirs de l'image du haut représente le locus coeruleus. Leur présence dans les souris SHIP2<sup>Δ/Δ</sup> certifie que le gène Phox2a est intacte dans ces souris. L'image du bas représente un grossissement du *locus coeruleus*. Statistiques (non-parametric two-tailed Mann-Whitney U-test) : \*\*\*p<0.001. Adapté de (Dubois et al., 2012)

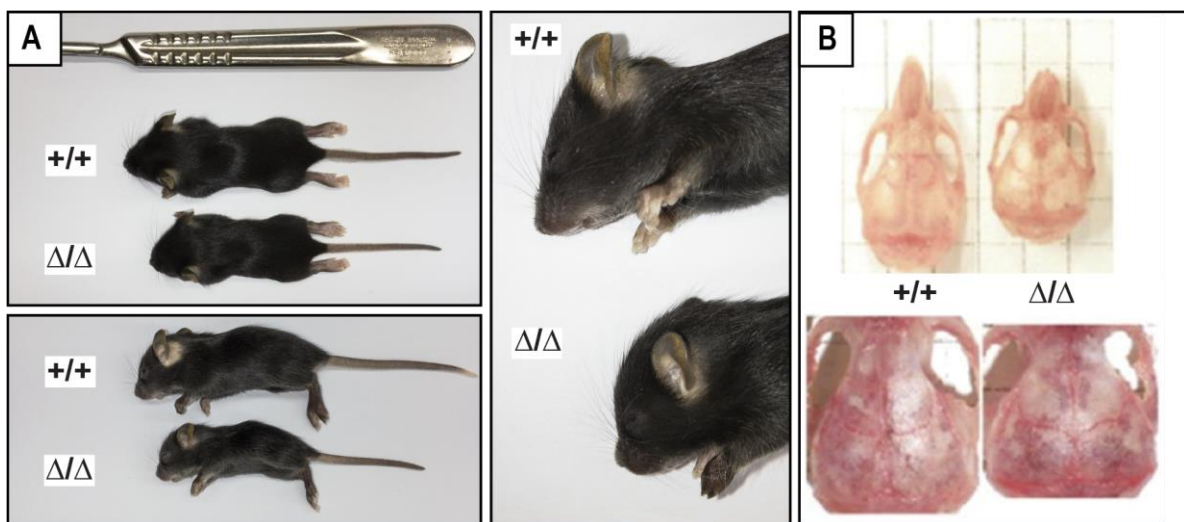
## 4.2 Caractéristiques

Les souris SHIP2<sup>Δ/Δ</sup> sont viables et la fréquence des génotypes suit les lois de Mendel. Elles expriment exclusivement une protéine SHIP2 tronquée de 57 acides aminés, mais à un niveau réduit d'environ 65% comparé à la protéine sauvage exprimée par les souris SHIP2<sup>+/+</sup> (Figure 31B-C). La perte

d'activité catalytique 5-phosphatase a été confirmée par un test de libération de phosphate en présence du substrat PI(3,4,5)P<sub>3</sub> (Dubois et al., 2012) (Figure 31D).

Le remplacement de la protéine sauvage par cette protéine SHIP2  $\Delta$  engendre une série d'anomalies développementales et métaboliques.

Les souris SHIP2  $\Delta/\Delta$  présentent un retard de croissance : elles ont une taille réduite de 15% et un poids corporel diminué de 20% en comparaisont aux souris SHIP2<sup>+/+</sup> de même âge et de même sexe (Figure 33A-B). Elles présentent également des anomalies crânielles : une tête arrondie et un museau court associés à un crâne arrondi et plus court mais où les sutures osseuses crâniennes sont normales (Figure 32A-B). Ces anomalies sont présentes indifféremment du sexe et apparaissent peu avant le sevrage (Dubois et al., 2012).



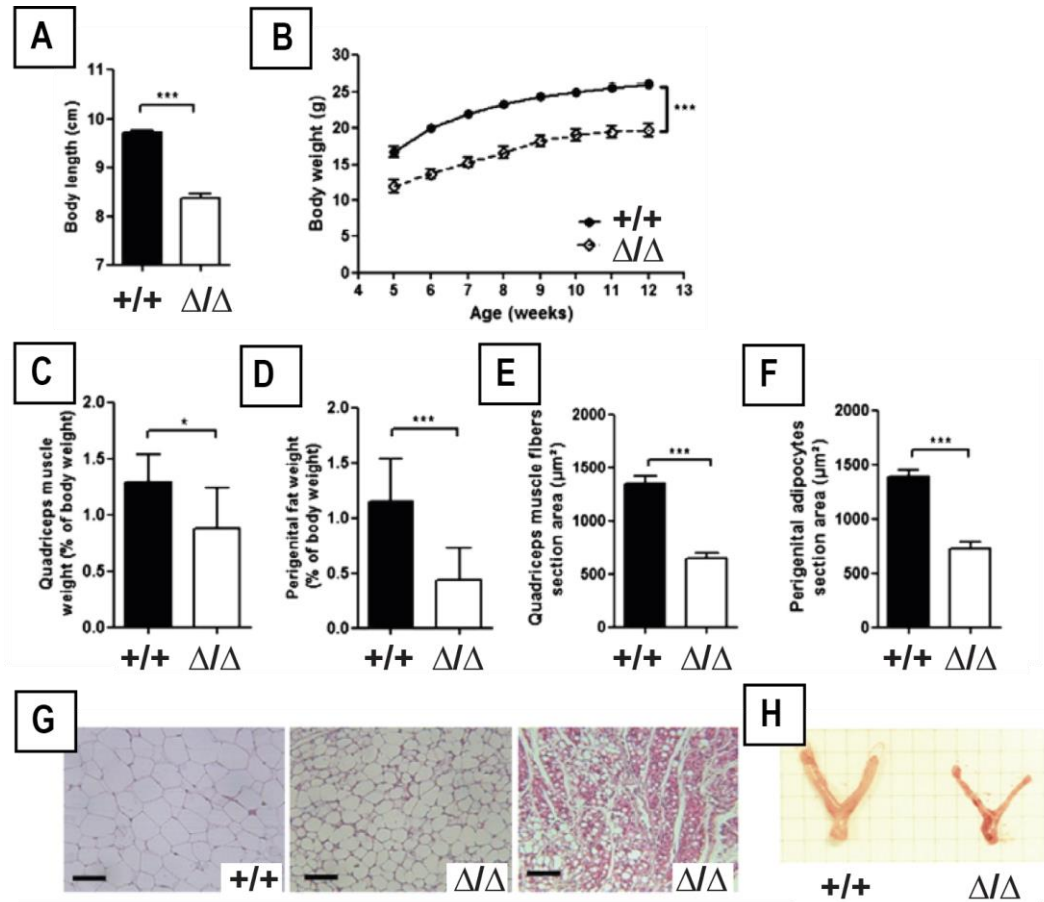
**Figure 29. Phénotype de la souris SHIP2 $\Delta/\Delta$  générée par Dubois.** A. Les souris SHIP2 $\Delta/\Delta$  ( $\Delta/\Delta$ ) présentent un retard de croissance avec une taille réduite de 15% et un poids corporel diminué de 20% comparés aux souris contrôles SHIP2<sup>+/+</sup> (+/+) de même âge et de même sexe. Elles présentent également une dysmorphie faciale composée d'une tête arrondie et un museau court associés à un crâne arrondi (B.) et plus court mais où les sutures osseuses crâniennes sont normales. Ces anomalies sont présentes indifféremment du sexe et apparaissent peu avant le sevrage (Dubois et al. 2012). Adapté de (Dubois et al., 2012; Vande Catsyne et al., 2020).

Le poids des muscles squelettiques (quadriceps fémoral) et l'adiposité (graisse périgonadique) sont également diminués chez ces souris génétiquement modifiées par rapport aux souris contrôles. L'analyse histologique de ces tissus a mis en évidence une réduction de la surface de section des fibres musculaires et de la taille des adipocytes. Le nombre d'adipocytes est également diminué, mais uniquement chez 25% des souris SHIP2 $\Delta/\Delta$  analysées. Le tractus génital femelle des souris SHIP2 $\Delta/\Delta$  présente des anomalies de développement (Dubois et al., 2012) (Figure 33C-H).

Les souris SHIP2 $\Delta/\Delta$  présentent également une augmentation du taux d'adiponectine, une diminution du taux de leptine, une hyperphagie, et un taux de cholestérol et de triglycérides diminués. Ces anomalies semblent toucher plus intensément les souris mâles. Bien qu'aucune différence n'ait été identifiée sur la



tolérance au glucose ni à la sensibilité à l'insuline, ces souris présentent des anomalies de sécrétion de l'insuline (Dubois et al., 2012).



**Figure 33. Altérations développementales des souris  $SHIP2^{\Delta/\Delta}$**  (Dubois et al., 2012). Moyenne  $\pm$  SEM de la taille du corps (A.) et du poids (B.) de souris mâles ( $SHIP2^{+/+}$  ( $+/+$ )  $n=15$  ;  $SHIP2^{\Delta/\Delta}$  ( $\Delta/\Delta$ )  $n=12$ ) âgées de 16 semaines. Les souris  $SHIP2^{\Delta/\Delta}$  sont significativement plus courtes et plus légères que les souris  $SHIP2^{+/+}$ . C-D. Les poids du quadriceps fémoral et de la graisse périgénitale sont significativement moins élevés chez les souris mâles  $SHIP2^{\Delta/\Delta}$  ( $n=5$ ) que les souris  $SHIP2^{+/+}$  ( $n=7$ ). Chaque colonne représente la moyenne  $\pm$  SD et le poids de l'organe relatif au poids de la souris. E-F. Moyenne  $\pm$  SEM de fibres musculaires du quadriceps ( $n=74$  fibers) et de zones de coupes adipocytaires périgénitales ( $n=100$  adipocytes). Les fibres musculaires et la taille de la zone de coupe sont significativement diminuées chez les souris  $SHIP2^{\Delta/\Delta}$  par rapport aux souris  $SHIP2^{+/+}$ . G. Images de coupes hématoxyline/éosine de la graisse périgénitale d'une souris  $SHIP2^{+/+}$  et de deux souris  $SHIP2^{\Delta/\Delta}$ . Le nombre et la taille des adipocytes sont significativement diminués chez les souris mutantes (Echelle : 100 $\mu m$ ). H. Images représentatives du tractus génital de souris âgées de 16 semaines  $SHIP2^{+/+}$  et  $SHIP2^{\Delta/\Delta}$ . Statistiques (non-parametric two-tailed Mann-Whitney  $U$ -test): \* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$  ; \*\*\* $p < 0.001$ . Adapté de (Dubois et al., 2012).



---

# Objectifs

---



Lorsque l'on parcourt la littérature sur la protéine SHIP2, on remarque que cette 5-phosphatase a surtout été étudiée dans le cadre de son rôle dans des processus physiologiques comme l'adhésion, la migration, la prolifération et la survie cellulaire, ainsi que dans les voies de signalisation des facteurs de croissance et de l'insuline. Les résultats de ces analyses publiées montrent que ces paramètres se trouvent souvent altérés lorsque l'enzyme SHIP2 est inactivée ou surexprimée selon le modèle murin étudié. Mais parmi les modèles murins d'inactivation de SHIP2, plusieurs présentent également des modifications morphologiques, comme un retard de croissance et des anomalies faciales qui jusqu'à présent avaient été peu abordées dans la littérature.

Bien qu'encore limité, le recensement croissant du nombre d'individus atteints d'opsismodysplasie permet d'en dégager certaines caractéristiques. Un an avant le début de ce travail, plusieurs groupes de chercheurs ont établi un lien entre l'inactivation de l'enzyme SHIP2 chez l'homme et l'opsismodysplasie. Il devenait important de comparer les anomalies de développement du squelette présentes chez les souris SHIP2<sup>Δ/Δ</sup> avec celles publiées sur les patients souffrant d'opsismodysplasie.

On constate qu'il y a une ressemblance entre le phénotype des souris et celui des patients mais il reste de nombreuses inconnues quant au mécanisme menant de la mutation inactivatrice de SHIP2 à la maladie. Les quelques analyses histologiques réalisées chez les patients ont montré des altérations sévères de la plaque de croissance, ce qui pourrait expliquer en partie le phénotype.

Par conséquent, les objectifs de ce travail sont :

1. **Définir si la souris SHIP2<sup>Δ/Δ</sup> peut servir de modèle pertinent pour étudier l'OPS humaine.**  
Pour cela, l'ossification endochondrale d'os longs de souris SHIP2<sup>Δ/Δ</sup> a été étudiée afin d'identifier d'éventuelles anomalies architecturales et de les comparer avec celles précédemment identifiées dans l'OPS.
2. **La fonction de SHIP2 dans des chondrocytes murins.** Sur base de cellules primaires et de cellules ATDC5, nous avons étudié l'effet de l'inactivation de l'activité 5-phosphatase de SHIP2 sur la formation de la matrice extracellulaire et la signalisation intracellulaire.



---

# Section expérimentale

---



## ———— Section expérimentale

### Etude :

Altered chondrocyte differentiation, matrix mineralization and  
MEK-Erk1/2 signaling in an INPPL1 catalytic knock-out mouse model  
of opsismodysplasia.

---





## *Préambule*

L'opsismodysplasie est une dysplasie squelettique sévère à transmission autosomale récessive causée par des mutations inactivatrices du gène *INPPL1/SHIP2*. Le mécanisme moléculaire qui mène de la mutation du gène à l'opsismodysplasie est totalement inconnu. Dans notre étude, nous avons utilisé une souris *SHIP2<sup>Δ/Δ</sup>* exprimant de manière réduite une protéine *SHIP2* tronquée catalytiquement inactive ainsi qu'une molécule inhibitrice de l'activité 5-phosphatase de la protéine afin d'investiguer *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro* le rôle de cette 5-phosphatase dans le développement de la plaque de croissance et la minéralisation. Premièrement, comme observé chez les patients opsismodysplasiques, l'inactivation catalytique de *SHIP2* chez la souris conduit à une réduction de la taille du corps, une réduction des os longs, un dysmorphisme cranio-facial, ainsi qu'à une réduction de la taille de la zone hypertrophique et des anomalies dans la minéralisation de la plaque de croissance. Deuxièmement, les anomalies osseuses intrinsèques liées à la présence de la protéine *SHIP2*  $\Delta$  sont suffisantes pour induire *ex-vivo* les altérations caractéristiques de l'opsismodysplasie sur la croissance osseuse, l'histologie et la minéralisation. Troisièmement, l'expression de l'ostéocalcine est significativement augmentée lorsque *SHIP2* est inactivé dans des chondrocytes primaires en culture, et associée à une diminution de la formation de nodules minéralisés. Le ciblage de l'ARNm de l'ostéocalcine par un shRNA spécifique augmente la production de nodules minéralisés. Quatrièmement, les niveaux de phosphorylation de MEK et ERK1/2 sont significativement augmentés lorsque l'activité catalytique de *SHIP2* est diminuée ou absente dans des chondrocytes primaires stimulés avec du sérum et de l'IGF-1, mais pas avec du FGF2, comparés aux contrôles. Le traitement de chondrocytes et de métatarses en culture avec un inhibiteur de la phosphorylation de MEK rétablit partiellement la formation de nodules minéralisés, la taille de la zone hypertrophique et la croissance osseuse, permettant d'envisager un jour un traitement qui pourrait permettre de réduire le phénotype observé.

Ensemble, ces résultats indiquent que les souris *SHIP2<sup>Δ/Δ</sup>* représentent un modèle pertinent pour l'opsismodysplasie humaine. Ils permettent de souligner le rôle de *SHIP2* dans les chondrocytes durant l'ossification endochondrale. Finalement, nous avons mis en évidence le rôle de l'ostéocalcine dans la synthèse de nodules minéralisés et celui de la voie de signalisation MEK-ERK1/2 dans le phénotype opsismodysplasique.



---

## Section expérimentale

### Etude :

Altered chondrocyte differentiation, matrix mineralization and MEK-Erk1/2 signaling in an INPPL1 catalytic knock-out mouse model of opsismodysplasia.

---

<i>Advances in Biological Regulation ;76 (2020):100651</i>
--

Charles-Andrew Vande Catsyne, Sufyan Ali Sayyed, Patricia Molina-Ortiz, Bastien Moës, David Communi, Joséphine Muller, Roy Heusschen, Jo Caers, Abdelhalim Azzia, Christophe Erneux, Stéphane Schurmans





Contents lists available at ScienceDirect

## Advances in Biological Regulation

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jbior](http://www.elsevier.com/locate/jbior)

## Altered chondrocyte differentiation, matrix mineralization and MEK-Erk1/2 signaling in an *INPPL1* catalytic knock-out mouse model of opsismodysplasia



Charles-Andrew Vande Catsyne<sup>a</sup>, Sufyan Ali Sayyed<sup>a,1</sup>, Patricia Molina-Ortiz<sup>a,2</sup>, Bastien Moes<sup>a</sup>, David Communi<sup>b</sup>, Joséphine Muller<sup>c</sup>, Roy Heusschen<sup>c,3</sup>, Jo Caers<sup>c</sup>, Abdelhalim Azzi<sup>a</sup>, Christophe Erneux<sup>b</sup>, Stéphane Schurmans<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Functional Genetics, GIGA-Molecular Biology of Disease, GIGA-B34, CHU Sart-Tilman, University of Liège, avenue de l'Hôpital 11, 4000, Liège, Belgium

<sup>b</sup> IRIBHM, Bat. C, Campus Hôpital Erasme, Université Libre de Bruxelles, route de Lennik 808, 1070, Bruxelles, Belgium

<sup>c</sup> Laboratory of Hematology, GIGA-Inflammation, Infection & Immunity, GIGA-B34, CHU Sart Tilman, University of Liège, avenue de l'Hôpital 11, 4000, Liège, Belgium

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Skeletal dysplasia  
Opsismodysplasia  
Chondrocytes  
Ship2  
Inpp1l  
Osteocalcin  
Endochondral ossification  
Bone mineralization

## ABSTRACT

Opsismodysplasia (OPS) is a rare but severe autosomal recessive skeletal chondrodysplasia caused by inactivating mutations in the *Inpp1l/Ship2* gene. The molecular mechanism leading from *Ship2* gene inactivation to OPS is currently unknown. Here, we used our *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> mouse expressing reduced amount of a catalytically-inactive SHIP2 protein and a previously reported SHIP2 inhibitor to investigate growth plate development and mineralization *in vivo*, *ex vivo* and *in vitro*. First, as observed in OPS patients, catalytic inactivation of SHIP2 in mouse leads to reduced body length, shortening of long bones, craniofacial dysmorphism, reduced height of the hypertrophic chondrocyte zone and to defects in growth plate mineralization. Second, intrinsic *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> bone defects were sufficient to induce the characteristic OPS alterations in bone growth, histology and mineralization *ex vivo*. Third, expression of osteocalcin was significantly increased in SHIP2-inactivated chondrocyte cultures whereas production of mineralized nodules was markedly decreased. Targeting osteocalcin mRNA with a specific shRNA increased the production of mineralized nodules. Fourth, levels of p-MEK and p-Erk1/2 were significantly increased in SHIP2-inactivated chondrocytes in response to serum and IGF-1, but not to FGF2, as compared to control chondrocytes. Treatment of chondrocytes and bones in culture with a MEK inhibitor partially rescued the production of mineralized nodules, the size of the hypertrophic chondrocyte zone and bone growth, raising the possibility of a treatment that could partially reduce the phenotype of this severe condition.

Altogether, our results indicate that *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> mice represent a relevant model for human OPS. They also highlight the important role of SHIP2 in chondrocytes during endochondral ossification

\* Corresponding author. Laboratory of Functional Genetics, GIGA-Molecular Biology of Disease, GIGA-B34, Centre Hospitalier Universitaire Sart-Tilman, Université de Liège, avenue de l'Hôpital 11, 4000, Liège, Belgium.

E-mail address: [sschurmans@uliege.be](mailto:sschurmans@uliege.be) (S. Schurmans).

<sup>1</sup> Sufyan Ali Sayyed: Ablynx, Technologiepark-Zwijnaarde 21, 9052 Zwijnaarde, Belgium.

<sup>2</sup> Patricia Molina-Ortiz: BioIVT, 15 Albert Drive, Burgess Hill, West Sussex RH 15 9 TN, United Kingdom.

<sup>3</sup> Roy Heusschen: AstraZeneca, Alfons Gossetlaan 40 bus 201, 1702 Groot-Bijgaarden, Belgium.

<https://doi.org/10.1016/j.jbior.2019.100651>

Received 16 May 2019; Received in revised form 30 August 2019; Accepted 3 September 2019

Available online 05 September 2019

2212-4926/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

and its different differentiation steps. Finally, we identified a role of osteocalcin in mineralized nodules production and for the MEK-Erk1/2 signaling pathway in the OPS phenotype.

## 1. Introduction

Opsismodysplasia (OPS, OMIM 258480) is a rare but severe autosomal recessive skeletal chondrodysplasia clinically characterized by short stature, short limbs, small hands and feet, macrocephaly and a specific facial dysmorphism (Maroteaux et al., 1984; Beemer and Kozłowski, 1994; Tyler et al., 1999; Cormier-Daire et al., 2003). The clinical outcome is variable, ranging from embryonic or early postnatal lethality to longer survival, which may sometimes reach more than 20 years (Maroteaux et al., 1984; Beemer and Kozłowski, 1994; Tyler et al., 1999; Cormier-Daire et al., 2003; Below et al., 2013; Huber et al., 2013; Iida et al., 2013). Typical radiographic features include short long bones with markedly delayed epiphyseal mineralization, metaphyseal cupping, short metacarpals and phalanges, and severe platyspondyly. Histological studies on bones from affected OPS individuals are scarce in the literature, but growth plate alterations have been reported. Indeed, increased chondrocyte density and abnormal chondrocytes clustering in the resting zone have been observed, as well as a nearly lack of columnar organization in the proliferative zone and a reduced height and cell density of the hypertrophic zone. The mineralized matrix trabeculae were reported to be either thick or short but always irregular (Tyler et al., 1999; Cormier-Daire et al., 2003; Huber et al., 2013). These histological alterations were observed in all OPS cases analyzed, but varied markedly in severity among patients, paralleling the variability of the radiological and clinical manifestations (Cormier-Daire et al., 2003). In 2013, it was reported that OPS is the consequence of homozygous or compound heterozygous mutations in the *Inpp1* gene, encoding for the SHIP2 protein (Below et al., 2013; Huber et al., 2013; Iida et al., 2013). More than 25 different mutations have been detected in OPS individuals, including nonsense, in-frame, missense, frameshift and splice site mutations. Most of them are predicted to severely alter or inactivate the catalytic function of the SHIP2 protein, but the molecular mechanisms of the disease are currently not understood (Below et al., 2013; Huber et al., 2013; Iida et al., 2013; Fradet and Fitzgerald, 2017). SHIP2 is a member of the inositol polyphosphate 5-phosphatases family and its catalytic activity is directed against both phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>) and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) (Giurato et al., 2002; Zhang et al., 2007; Elong Edimo et al., 2014, 2016; Thomas et al., 2017). In addition to its central catalytic domain, the 1258 amino acids SHIP2 protein contains several motifs known to be involved in protein-protein interactions, meaning that SHIP2 is also a docking protein for specific intracellular molecules. The SHIP2 protein is largely expressed in hematopoietic and non-hematopoietic cells during embryonic and adult life (Schurmans et al., 1999; Muraille et al., 2001). Functionally, SHIP2 is important for the control of many cellular processes, including cell migration, proliferation and adhesion, endocytosis, as well as for insulin and growth factors signaling (Suwa et al., 2010; Hakim et al., 2012; Dyson et al., 2012; Elong Edimo et al., 2014; Thomas et al., 2017; Ramos et al., 2019). Analysis of SHIP2 functions *in vivo* in genetically-modified mice and zebrafish revealed that PI3-kinase (PI3K) and mitogen-activated protein kinases (MAPK) signaling pathways are altered upon SHIP2 total or catalytic knock-out, leading to growth defects (Sleeman et al., 2005; Juryneć et al., 2010; Dubois et al., 2012). Despite the fact that inactivating mutations in the *Inpp1* gene are responsible for OPS chondrodysplasia, the presence of the Ship2 protein in chondrocytes and its role during endochondral ossification are still largely unknown. In this study, we asked whether our *Ship2* catalytic knock-out mouse would be a relevant model for human OPS and to analyze the expression and whether this model would be suitable to analyze the role of SHIP2 in chondrocytes during endochondral ossification.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Mice

*Ship2*<sup>+/-Δ</sup> mice were generated on a mixed 129xC57BL/6 genetic background (Dubois et al., 2012). *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> mice have both *Ship2* exons 18 and 19 deleted but still express a truncated and catalytically-inactive SHIP2 protein. All mice were housed in an animal facility with a 12 h light/12 h dark cycle and had free access to food and water throughout the study period. All mouse studies were authorized by the Animal Care Use and Review Committee of the Université de Liège.

### 2.2. Histological analysis

Tibias of 3 weeks old mice were isolated, formalin-fixed, demineralized during 12 h in dc2 qpath solution (11028304; VWR), paraffin-processed, cut, rehydrated and subjected to Hematoxylin-Eosin and Safranin-O Fast Green staining according to standard procedures. Midsagittal sections of the proximal growth plate of the tibia were selected for measurements.

### 2.3. Micro-computed tomography analysis

Femurs were isolated, fixed and stored in 70% ethanol at 4 °C. Micro-computed tomography (μCT) was performed on the distal femur with a Skyscan 1172 (Bruker). The scanner source was set at 50 kV and 200 μA, and a 0.5 mm aluminium filter was applied. The pixel size was 5 μm<sup>2</sup>. Images were captured every 0.4° through 180 degrees of rotation using Skyscan software (Bruker).



Reconstruction was performed with NRecon software (Bruker). Morphometric 3D analysis of trabecular bone was performed on a 1.5 mm section starting 0.5 mm from the growth plate using CT Analyzer software (Bruker). Morphometric 2D and 3D analysis of cortical bone was performed on a 0.5 mm section starting 3 mm from the growth plate. 3D images of bones were generated using CT Vol software (Bruker). The number of cortical perforations was counted manually on radiographs.

#### 2.4. Monolayer culture of primary chondrocytes

Primary chondrocytes were prepared from 2 to 3 day-old newborn mice as described (Jonason et al., 2015). Briefly, newborn sternum and ribs were dissected and predigested with 3 mg/ml collagenase D (11088866001; Roche) in 1:1 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)/F-12 medium (11514436; Gibco) at 37 °C for 60 min and further digested in 0.5 mg/ml collagenase D at 37 °C overnight. Primary chondrocytes were cultured in chondrogenic differentiation medium containing 1:1 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)/F-12 medium (Gibco), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (Gibco), 0.25 g/ml Fungizone (Gibco), 1% L-glutamine (Gibco), 50 µg/ml L-ascorbic acid, 10 mM β-glycerophosphate for 5 days. All cultures were maintained at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator in the presence of 10 µM of AS1949490 Ship2 inhibitor (Tocris) or DMSO. The medium was changed every two days. The last day, cells were starved for 4 h in absence of serum, L-ascorbic and β-glycerophosphate. Cells were stimulated with 10 ng/mL mouse IGF-1 (I8779-Sigma) for 5 min or mouse FGF-2 (SRP4038-Sigma) for 30 min then subjected for Western blotting and immunodetection. The viability of *Ship2*<sup>+/+</sup> primary chondrocytes was tested using a MTT assay (CGD1-1 KT, Sigma).

#### 2.5. Micromass culture of primary chondrocytes and ATDC5 cells

Primary chondrocytes, prepared from 2 to 3 day-old newborn mice as described above, and ATDC5 cells (Sigma, 1 x 10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup>) were cultured in chondrogenic differentiation medium containing 1:1 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)/F-12 medium (Gibco), supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (Gibco), 1% L-glutamine (Gibco), 1% ITS + 1 (Sigma), 50 µg/ml L-ascorbic acid and 10 mM β-glycerophosphate. After 10 days of differentiation, cells were centrifuged to obtain a density of 2 x 10<sup>7</sup> cells/ml. Cell suspension (10 µl) was then placed in 24-well plates (Corning) at the center of each well for 2–3 h before adding chondrogenic differentiation medium, which allowed cells to form 3-dimensional (3D) micromass (Thirion and Berenbaum, 2004; Seriwatanachai et al., 2012). All cultures were maintained at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator in the presence of 10 µM of AS1949490 SHIP2 inhibitor (Tocris) or DMSO. The medium was changed every two days until 14 days.

#### 2.6. Transduction of chondrocyte micromass cultures with shRNA-expressing lentiviral preparations

Lentiviral plasmids expressing EGFP, a puromycin resistance gene and a shRNA were purchased to VectorBuilder. Two shRNAs directed against the mouse osteocalcin (*Bglap*) mRNA (target sequences: 5'- CCTGCTTGACGAGCTATCA-3' and 5'- TGCCAAGCAGGAGGGCAATA-3') and one control shRNA (non-target sequence: 5'- CCTAAGGTTAAGTCGCCCTCG-3') were used. Lentiviral preparations were generated by the Viral Vectors platform of our institute. Briefly Lenti-X 293T cells (Clontech®, 632180) were co-transfected with a pSPAX2 (Addgene®, Cambridge, MA, USA) and a VSV-G encoding vector. Culture supernatants were collected 48 h, 72 h and 96 h post transfection, filtrated (0.2 µM) and concentrated by ultracentrifugation. The lentiviral preparations were then titrated with a qPCR Lentivirus Titration Kit (ABM®, LV900, Richmond, BC, Canada) in order to estimate the number of transducing unit per mL (TU/mL). ATDC5 cells were transduced with lentiviral vectors (30 TU/cell) and then incubated with 5 µg/mL puromycin. Primary chondrocytes were transduced with lentiviral vectors (50 TU/cell) and then incubated with 1 µg/mL puromycin for 3 days. Transduced ATDC5 cells and primary chondrocytes were transferred into 24well plate in micromass and cultured for 14 days to allow mineralization of the matrix.

#### 2.7. Quantification of proteoglycan accumulation and mineralizing nodule production

Cell micromasses were cultured in DMSO or 10 µM AS1949490 SHIP2 inhibitor containing differentiation media before proteoglycan accumulation and mineralizing nodule production were quantified on day 7, 14 and 21. The micromasses were washed twice with PBS and fixed for 20 min in 10% formalin (Sigma). They were then incubated with 0.1% alcian blue 8GX (Sigma) in 0.1 M HCl for 2 h to stain proteoglycans, or with 2% alizarin red S (Sigma) in water pH 4.2 for 30 min to stain mineralizing nodules. After being photographed with an Apple® iPhone 6S coupled with a stereomicroscope, the alcian blue dye was extracted with 6 M guanidine-HCl and the alizarin red S dye was extracted with 10% acetic acid. The optical density was determined at 595 nm (alcian blue) and 405 nm (alizarin red S) by standard spectrophotometric method.

#### 2.8. Quantification of osteocalcin and osteopontin levels

Levels of mouse GLA-osteocalcin and osteopontin were measured in supernatants from primary sternal chondrocytes cultures using ELISA kits (MK 127 from Takara Bio Inc, Shiga, Japan and EMSPP1 from Thermo Fisher scientific, Massachusetts, USA, respectively).

## 2.9. Immunofluorescence

Mouse primary chondrocytes (250000 cells/well in 24-well plate) or ATDC5 cells (40000 cells/well in 24-well plate) were cultured in differentiation medium for 4 days and fixed in 10% formalin (Sigma). Permeabilization was performed with 0.3% Triton X-100 or with cold methanol ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) during 10 min. Non-specific binding sites were blocked by 10% FBS for 60 min at room temperature. Thereafter, samples were incubated at  $4^{\circ}\text{C}$  overnight with 1:200 polyclonal rabbit anti-mouse phospho-ERK primary antibody (#9101 Cell Signaling) or 1:400 polyclonal mouse SHIP2 antibody (sc-166641 Santa Cruz) and then with 1:400 goat anti-rabbit or anti-mouse coupled with FITC secondary antibodies (Sigma) and DAPI. Regarding the negative control slides, cells were incubated without primary antibody. Images were captured with Nikon A1R microscope and processed with ImageJ®.

## 2.10. Ex vivo culture of mouse metatarsals

Metatarsal bones were isolated from 2 to 3 day-old newborn mice dissected under sterile conditions. The isolated neonatal bones were cultured in alpha-MEM (Gibco) with 0.2% FBS, 100 U/ml penicillin, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin (Gibco), 1% L-glutamine (Gibco), 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  L-ascorbic acid, 1 mM  $\beta$ -glycerophosphate. Cultured bones were maintained at  $37^{\circ}\text{C}$  in a humidified 5%  $\text{CO}_2$  incubator in the presence of vehicle, 10  $\mu\text{M}$  of AS1949490 SHIP2 inhibitor (Tocris) with or without 0.5  $\mu\text{M}$  SL327 MEK inhibitor (Sigma). Bones were measured daily with a stereo-microscope until day 8, fixed in 70% ethanol and stored at  $4^{\circ}\text{C}$ . There were paraffin-processed, cut, rehydrated and subjected to Safranin-O Fast Green and Von Kossa counterstained with Hematoxylin according to standard procedures. 4 midsagittal sections per samples were selected for measurements.

## 2.11. RNA quantification

RNA was isolated from cells by collecting the aqueous phase after phase separation with TRI reagent (Sigma) and chloroform. RNA was precipitated with isopropanol (30 min at  $-80^{\circ}\text{C}$ ) and centrifuged for 15 min at  $20000 \times g$  at  $4^{\circ}\text{C}$ . RNA pellets were washed with 75% ethanol. After subsequent ethanol precipitation, RNA was dissolved in DNase/RNase free water. RNA quantity and purity were determined spectrophotometrically (Nanodrop, Thermofisher). Total RNA was reverse transcribed using iScript Synthesis Kits (Biorad). Real time quantitative PCR (RT-qPCR) was performed in 384-well optical plates. For each cDNA sample a mix was prepared consisting of Hot Firepol Evagreen qPCR Mix Plus (Solis Biotdyne) and 600 nM forward and reverse oligonucleotides. A Taqman 7900HT Fast Real-time PCR system was used for amplification using the following protocol: denaturation at  $95^{\circ}\text{C}$  for 10 min, followed by 40 cycles of amplification (45 s at  $95^{\circ}\text{C}$ , 1 min at  $60^{\circ}\text{C}$ , 1 min at  $75^{\circ}\text{C}$ ) followed by a dissociation curve. Data were analyzed based on the relative quantification of mRNA expression of the target gene normalized to a housekeeping gene (*Gapdh*). Primer sequences are shown in S1 Table. Gene expression analyses are from representative experiments of at least three independent experiments.

## 2.12. Western blotting and immunodetection

Cells were lysed with protein lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH7.4; 100 mM NaCl; 5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 5 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 2% SDS, nuclease (Thermofisher), Phostop (ROCHE) and Protease inhibitor EDTA-free (ROCHE)), briefly sonicated for 20 s and centrifugated at  $4^{\circ}\text{C}$  for 5 min at  $10000 \times g$ . Proteins were quantified by using the Biorad Protein Assay according to manual instructions. They were denaturated in Laemmi sample buffer at  $95^{\circ}\text{C}$  for 5 min and equivalent amount of proteins were loaded for SDS-PAGE. Protein transfer to nitrocellulose membranes was performed with Biorad Transblot turbo according to kit instructions. Thereafter, membranes were blocked in 5% TBS-Tween 0.5% milk for 1 h prior to overnight incubation with primary antibody at  $4^{\circ}\text{C}$  (1:2000 polyclonal rabbit anti-mouse VINCULIN (#13901 Cell Signaling); 1:1000 polyclonal rabbit anti-mouse phospho-Akt<sup>T308</sup> primary antibody (#2965 Cell Signaling); 1:1000 polyclonal rabbit anti-mouse phospho-Akt<sup>S473</sup> primary antibody (#4060 Cell Signaling); 1:1000 polyclonal rabbit anti-mouse Akt primary antibody (#4691 Cell Signaling); 1:1000 polyclonal rabbit anti-mouse phospho-MEK primary antibody (#9154 Cell Signaling); 1:1000 polyclonal rabbit anti-mouse MEK primary antibody (#8727 Cell Signaling); 1:1000 polyclonal rabbit anti-mouse phospho-ERK primary antibody (#9101 Cell Signaling); 1:1000 polyclonal rabbit anti-mouse ERK primary antibody (#9102 Cell Signaling); 1:500 polyclonal mouse SHIP2 antibody; 1:1000 polyclonal rabbit anti-mouse OCN primary antibody (AB10911 Merck). After several washes, horseradish peroxidase (HRP)-linked secondary antibody (A9169 Sigma) was added for 1 h at room temperature.

## 2.13. Statistics

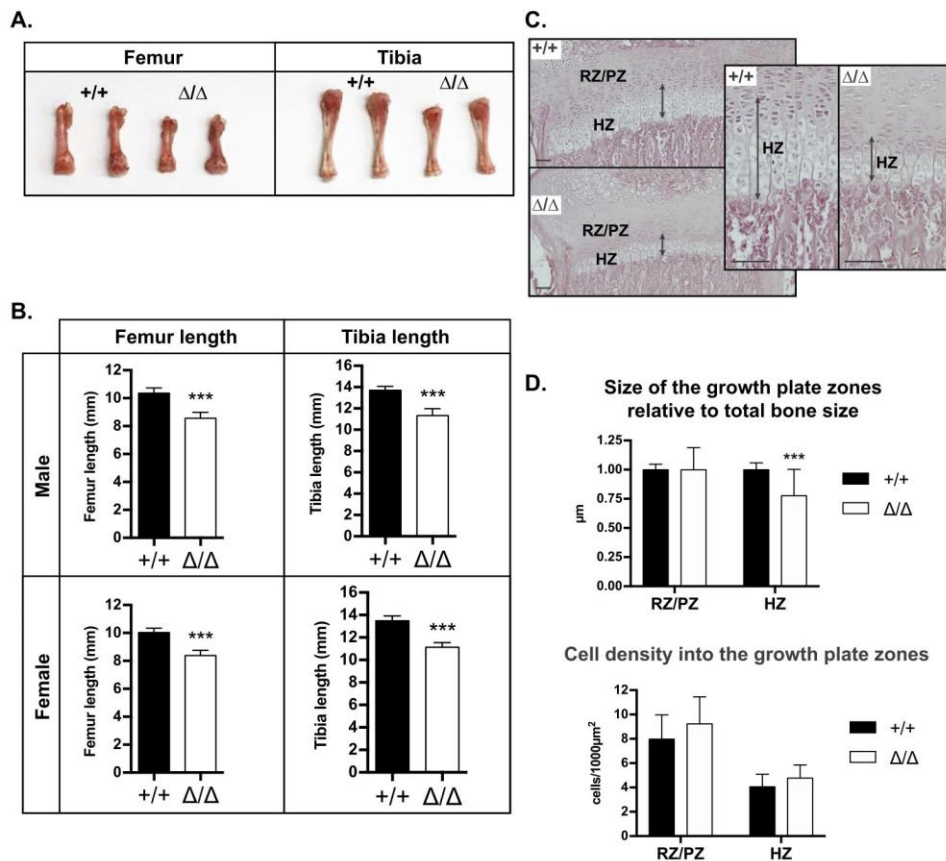
Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 7 Software (GraphPad Software, San Diego, CA). The statistical test used in each analysis is mentioned in the figure legends. Mice of the same age and the same sex were compared. Data are reported as means  $\pm$  SD of at least three independent experiments.  $p < 0.05$  was considered significant.



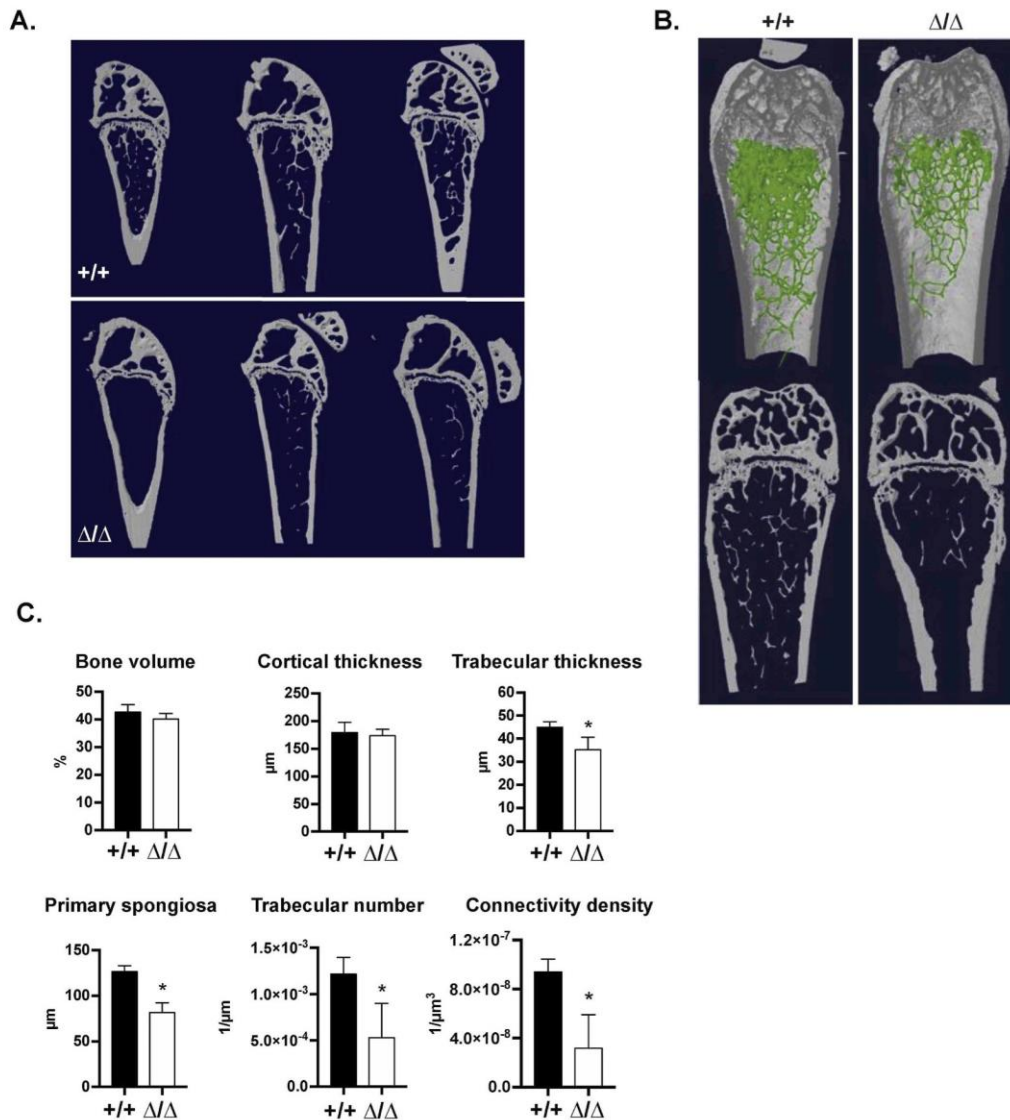
### 3. Results

#### 3.1. Shortening of bones in *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> mice is associated with a shorter hypertrophic chondrocytes zone, a reduced matrix mineralization and altered metaphysis architecture

After backcrosses for 10 generations with C57BL/6J mice, both male and female C57BL/6J *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> (*Ship2*<sup>Δ/Δ</sup>) mice still displayed reduced body length and body weight compared with age- and sex-matched C57BL/6J *Ship2*<sup>+/+</sup> (*Ship2*<sup>+/+</sup>) mice, as previously reported for *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> mice on a mixed 129 x C57BL/6J genetic background (Supplementary Figs. 1A–B, left panels) (Dubois et al., 2012). These *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> mice also exhibited the characteristic round skull and shortened snout (Supplementary Fig. 1B, right panel). Skeletal preparations from 3 week-old *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> mice showed proportional shortening of femur and tibia long bones (Fig. 1A and B). Histology of metaphyseal growth plates was examined in tibias of 3 week-old mice. The resting/proliferative chondrocytes zone was similar in *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> and *Ship2*<sup>+/+</sup> mice. By contrast, the height of the hypertrophic chondrocytes zone was significantly reduced in *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> mice, compared with *Ship2*<sup>+/+</sup> mice (Fig. 1C and D). Cell density was normal in resting/proliferative and hypertrophic chondrocytes zones (Fig. 1D). In order to determine the structural parameters of trabecular bone, micro-computed tomography (micro-CT) analysis of femurs harvested from 20 week-old mice was performed (Fig. 2A–C). The most impressive alterations detected in *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> femurs by micro-CT were a reduced length of the primary spongiosa and a decreased trabecular thickness, number and connectivity, compared with *Ship2*<sup>+/+</sup> mice (Fig. 2C). By contrast, no difference was observed in femur bone volume and cortical thickness (Fig. 2A–C).



**Fig. 1.** Altered endochondral ossification, including matrix mineralization, in 3 week-old *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> mice. **A.** Representative images of femurs and tibias isolated from 3 week-old *Ship2*<sup>+/+</sup> and *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> male mice. **B.** Mean  $\pm$  SD of femur and tibia length in 3 week-old male and female *Ship2*<sup>+/+</sup> and *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> mice, 8 to 14 mice per group. Statistics (t-test): \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001. **C.** Hematoxylin and eosin staining of proximal tibial metaphyseal growth plate sections from 3 week-old *Ship2*<sup>+/+</sup> and *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> mice at the same relative position through the joint. RZ: resting zone; PZ: proliferative zone; HZ: hypertrophic zone. The arrows indicate the height of the HZ. Right panels represent higher magnifications centered on the hypertrophic zone: the zone of hypertrophic chondrocytes is significantly reduced in *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> mice. Results are representative of 5 independent experiments. Bars: 100 μm in both panels. **D.** Height relative to the total bone size (upper graph) and cell density (lower graph) of resting/proliferative (RZ/PZ) and hypertrophic (HZ) zones from the proximal tibial metaphyseal growth plate in 3 week-old *Ship2*<sup>+/+</sup> and *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> mice. 3 sections from 5 mice were analyzed per group. Graphs show mean value  $\pm$  SD. Statistics (t-test): \*\*\* p < 0.001.



**Fig. 2.** Altered primary spongiosa length and trabeculae in *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> femurs. Micro-CT analysis of proximal femoral metaphysis from 20 week-old *Ship2*<sup>+/+</sup> and *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> mice: reduced primary spongiosa length and trabeculae are observed in *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> mice. **A.** Three representative sagittal sections are presented per genotype. **B.** Three-dimensional reconstruction of proximal metaphysis from frontal sections in *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> and *Ship2*<sup>+/+</sup> femurs: the green lines represent the overlay of trabeculae detected in the primary spongiosa by micro-CT analysis (upper images). A representative frontal section is presented per genotype in the lower images. **C.** Quantitative micro-CT analyses of proximal femoral metaphysis from 20 week-old *Ship2*<sup>+/+</sup> and *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> mice revealed that trabecular thickness, number and connectivity, as well as primary spongiosa length were significantly reduced in *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> mice, as compared to *Ship2*<sup>+/+</sup> mice. 3 mice were analyzed per group. Graphs show mean value ± SD. Statistics (t-test): \* p < 0.05.

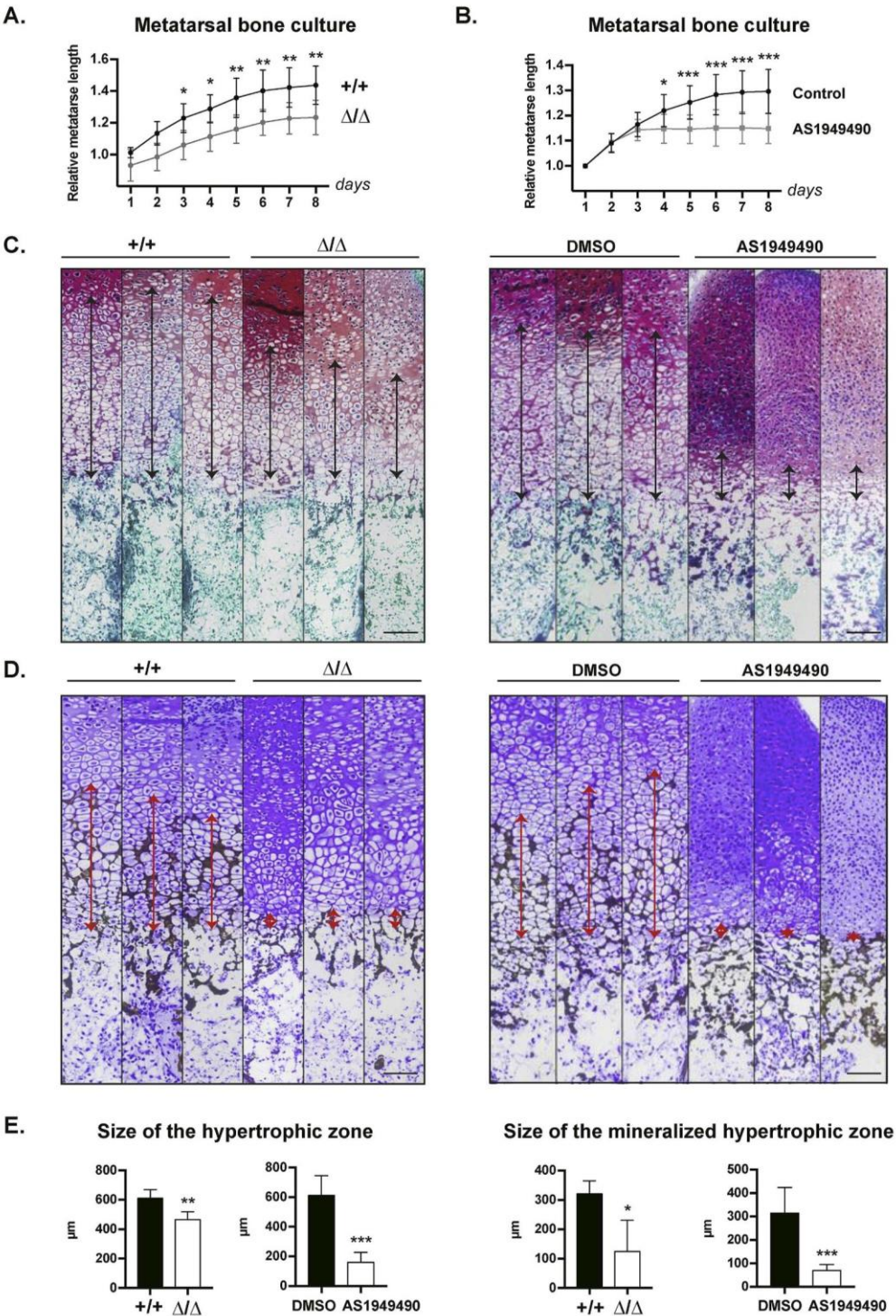
Altogether, these observations indicate that SHIP2 inactivation in mice resulted in altered endochondral ossification characterized by a shorter hypertrophic chondrocytes zone, a reduced matrix mineralization and altered architecture.

### 3.2. Intrinsic *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> bone factors are sufficient to alter bone growth, histology and mineralization after genetic or pharmacologic SHIP2 inactivation

In order to test if bone intrinsic and/or extrinsic defects resulting from SHIP2 inactivation are essential to induce bone alterations in *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> mice, metatarsals were isolated from 3 day-old *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> and *Ship2*<sup>+/+</sup> mice and cultured in the same conditions for 8 days. *Ex vivo* culture of *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> metatarsals reproduced the growth defect observed *in vivo* in *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> mice (Fig. 3A). A similar growth defect was observed when *Ship2*<sup>+/+</sup> metatarsals were cultured in the presence of the AS1949490 *Ship2* inhibitor (Fig. 3B).



This AS1949490 inhibitor had no significant effect on the viability of *Ship2*<sup>+/+</sup> primary chondrocytes which play an essential role in endochondral ossification during bone growth (Supplementary Fig. 2). Histology of metaphyseal growth plates was examined in metatarsals after 8 days of culture. No difference was detected in the resting/proliferative chondrocytes zone when SHIP2 was

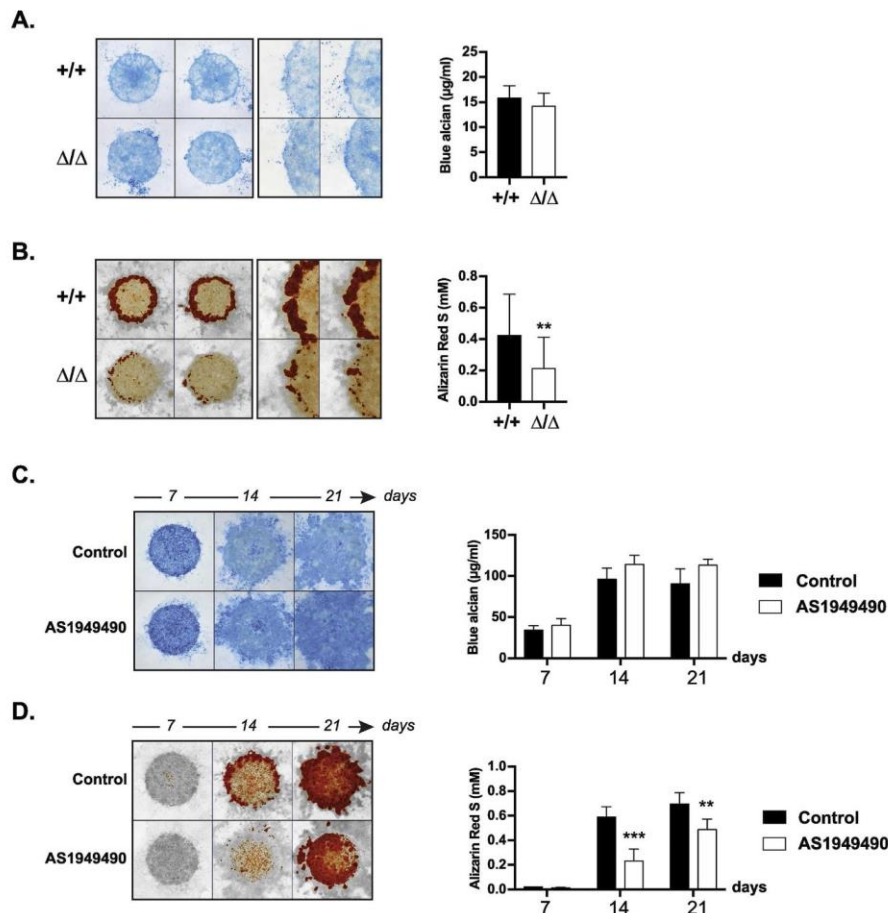


(caption on next page)

**Fig. 3. Intrinsic bone factors are sufficient to induce metatarsal bone growth, histological and mineralization defects after genetic or pharmacologic inactivation of SHIP2.** Second metatarsals were isolated from (A) 3 day-old *Ship2*<sup>+/+</sup> and *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> mice or from (B) 3 day-old *Ship2*<sup>+/+</sup> mice and cultured in the presence (AS1949490) or not (control) of the AS1949490 SHIP2 inhibitor. Bone length was analyzed every day in a 8 day-culture. Results are representative of 3 independent experiments. Graphs show metatarsal bone length, relative to *Ship2*<sup>+/+</sup> (A) or DMSO-treated (B) metatarsal bone length at day 1, presented as mean value ± SD. Statistics (2way ANOVA test): \*: *p* < 0.05; \*\*: *p* < 0.01; \*\*\*: *p* < 0.001. Safranin O and Fast-Green staining (C) and Von Kossa staining (D) of metaphyseal growth plate sections from metatarsals at the same relative position through the joint after 8 days in culture when SHIP2 is genetically (*Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> metatarsals) or pharmacologically (AS1949490 SHIP2 inhibitor-treated metatarsals, AS1949490) inactivated. RZ: resting zone; PZ: proliferative zone; HZ: hypertrophic zone. The arrows indicate the size of the HZ (C) and the size of the mineralized HZ (D). Scale bars: 100 μm. Results are representative of 3 independent experiments. E. Graphs show mean value ± SD of the HZ size (left) and the mineralized HZ size (right). Results are representative of 3 independent experiments. Statistics (t-test): \*: *p* < 0.05; \*\*: *p* < 0.01; \*\*\*: *p* < 0.001.

genetically or pharmacologically inactivated. By contrast, the height of the hypertrophic chondrocytes zone was significantly reduced, as observed above in tibias of *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> mice (Fig. 3C and E). The height of the mineralized hypertrophic zone was also significantly reduced in cultured *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> and SHIP2 inhibitor-treated metatarsals, as compared with *Ship2*<sup>+/+</sup> and DMSO-treated metatarsals, respectively (Fig. 3D and E).

Thus, our results indicated that intrinsic bone defects secondary to SHIP2 inactivation are sufficient to induce alterations in bone growth, histology and mineralization in *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> mice; our data also confirmed AS1949490 to be a suitable pharmacological tool to



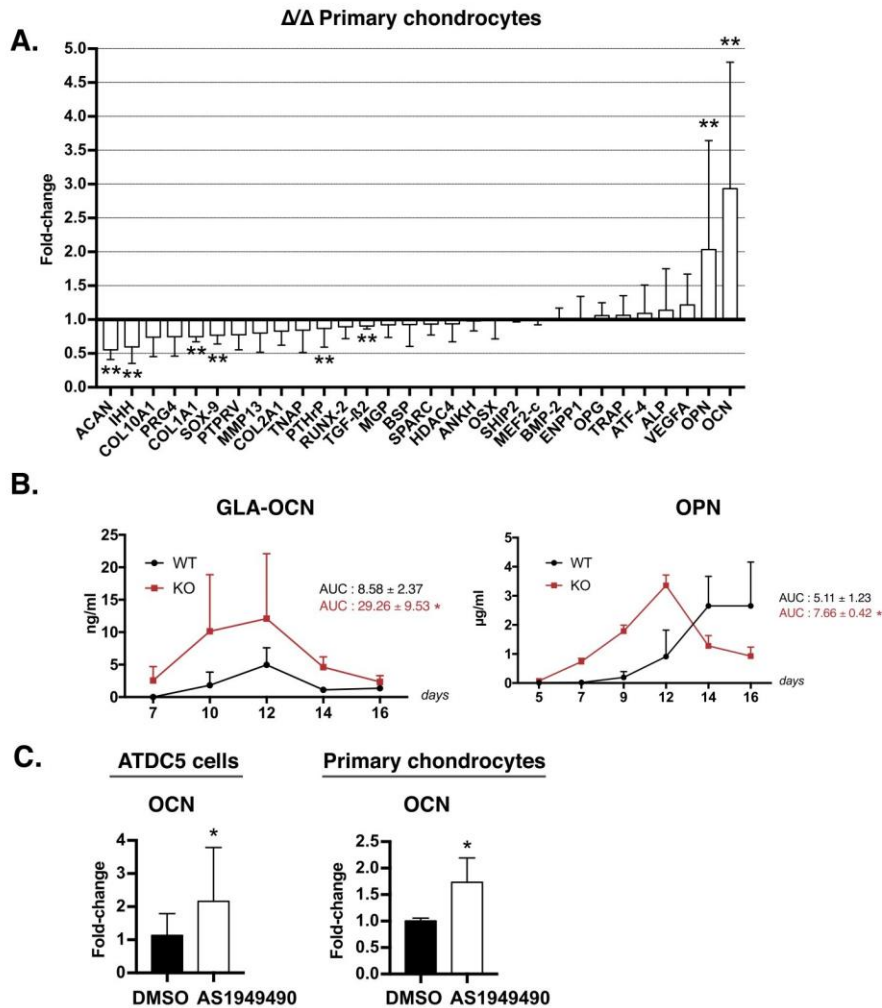
**Fig. 4. Genetic or pharmacologic SHIP2 inhibition decreases mineralized nodules formation in chondrocyte micromass culture.** A and C. Glycosaminoglycans accumulation (Alcian blue staining) in micromass culture of chondrocytes isolated from *Ship2*<sup>+/+</sup> and *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> thoracic cartilage (A), or from *Ship2*<sup>+/+</sup> thoracic cartilage and then treated with DMSO (control) or with 10 μM AS1949490 SHIP2 inhibitor (AS1949490) (C). B and D. Mineralized nodule formation (alizarin red S staining) in micromass culture of chondrocytes isolated from *Ship2*<sup>+/+</sup> and *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> thoracic cartilage (B) or from *Ship2*<sup>+/+</sup> thoracic cartilage and then treated with DMSO (control) or with 10 μM AS1949490 SHIP2 inhibitor (AS1949490) (D). Representative culture plates after 14 days (A–B, including higher magnifications in the 4 panels on the right) or after 7, 14 and 21 days (C–D) of culture are presented along with spectrophotometric data. Graphs show mean value ± SD. Results shown are representative of 4 independent experiments. Statistics (paired t-test): \*\*: *p* < 0.01; \*\*\*: *p* < 0.001.



reproduce genetic SHIP2 inactivation on bone growth, histology and mineralization.

### 3.3. Genetic and pharmacologic inactivation of SHIP2 leads to reduced matrix mineralization in chondrocyte micromass culture

Chondrocytes play an essential role during endochondral ossification. In order to study the effects of SHIP2 inactivation on chondrocyte differentiation *in vitro*, a chondrocyte micromass culture was developed from 3 day-old *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> and *Ship2*<sup>+/+</sup> mouse thoracic cartilage. Using Western blotting followed by immunodetection, the expression of the SHIP2 protein was detected in *Ship2*<sup>+/+</sup> chondrocyte preparations (Supplementary Fig. 3A). After 14 days of culture, chondrocytes isolated from *Ship2*<sup>+/+</sup> and *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup>



**Fig. 5. SHIP2 inactivation in chondrocyte micromass cultures leads to altered expression of markers for chondrocyte differentiation and matrix mineralization.** After 14 days of culture, total mRNA was extracted from primary *Ship2*<sup>+/+</sup> and *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> chondrocyte micromass cultures (A) as well as from primary *Ship2*<sup>+/+</sup> chondrocyte or ATDC5 cell micromass cultures treated (AS1949490) or not (DMSO) with 5  $\mu$ M AS1949490 SHIP2 inhibitor (C). Messenger RNA was reverse transcribed and quantified by PCR. Levels of mRNA expression, relative to the *Ship2*<sup>+/+</sup> culture (A) or the DMSO-treated cultures (C), is presented as means  $\pm$  SD of 4 independent experiments. Statistics (paired t-test): \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ . Abbreviations: ACAN: Aggrecan; ALP: Alkaline phosphatase; ANKH: progressive ankylosis protein homolog; ATF4: Activating transcription factor 4; BSP: Bone sialoprotein; ENPP1: Ectonucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase family member 1; MGP: Matrix gla protein; OCN: Osteocalcin; OPN: Osteopontin; OSX: Osterix; PRG4: Proteoglycan 4; PTPRV: Protein tyrosine phosphatase receptor V; SPARC: Osteonectin. **B.** Means  $\pm$  SD of carboxylated osteocalcin (GLA-OCN) and osteopontin (OPN) protein levels in *Ship2*<sup>+/+</sup> and *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> chondrocyte micromass culture supernatants, related to the time of culture. The graphs shown are representative of 2 independent experiments. The area under the curve (AUC) was calculated. Statistics (Student's t-test): \*:  $p < 0.05$ .

mice showed similar accumulation of highly sulfated glycosaminoglycans, as measured by alcian blue staining and spectrophotometric quantification (Fig. 4A). However, when compared with *Ship2*<sup>+/+</sup> chondrocyte cultures, *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> cultures showed significantly decreased alizarin red S staining, indicative of a markedly reduced production of mineralized nodules (Fig. 4B). Similar results were obtained when micromass cultures of primary chondrocytes isolated from *Ship2*<sup>+/+</sup> mice (Fig. 4C and D) or of the ATDC5 chondrocyte cell line (Supplementary Figs. 3B–C) were treated with 5–10 μM AS1949490. Indeed, after 7, 14 or 21 days of culture, SHIP2 inhibitor-treated cultures showed a significant decrease in alizarin red S staining/production of mineralized nodules whereas no difference was observed with DMSO-treated culture for alcian blue staining/glycosaminoglycans accumulation.

Altogether, the bone microCT observations *in vivo* in mice and the *in vitro* results obtained in chondrocyte micromass cultures indicated that decreased matrix mineralization is an important and reproducible element of the *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> skeletal dysplastic phenotype.

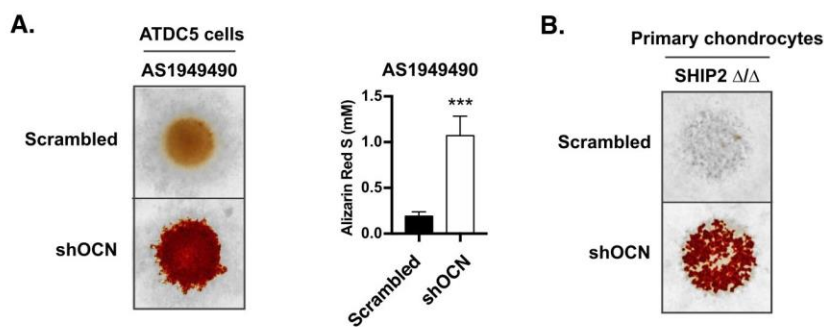
### 3.4. SHIP2 inactivation leads to increased osteocalcin expression in chondrocyte micromass cultures

In order to define the molecular mechanisms of decreased matrix mineralization upon SHIP2 inactivation, the expression of a large set of genes implicated in endochondral ossification was analyzed at the mRNA level in *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> and *Ship2*<sup>+/+</sup> chondrocyte micromass cultures. Level of specific mRNAs encoding for proteins expressed in resting and proliferative chondrocytes (Acan, Sox-9, PTHrP), prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes (IHH) as well as during matrix mineralization (osteocalcin and osteopontin) and osteogenesis (Col1a1) were altered upon genetic SHIP2 inactivation (Fig. 5A). At the protein level, when compared with *Ship2*<sup>+/+</sup> chondrocyte micromass culture supernatants, concentrations of carboxylated osteocalcin (GLA-osteocalcin) and osteopontin, both known to be important inhibitors of bone matrix mineralization *in vivo* (Ducy et al., 1996; Bailey et al., 2017), were also increased in *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> supernatants (Fig. 5B). Level of osteocalcin mRNA was also higher in chondrocyte micromass cultures of *Ship2*<sup>+/+</sup> primary chondrocytes and of ATDC5 cells, a well-established *in vitro* model of endochondral ossification, upon treatment with 5 μM AS1949490, indicating that both genetic and pharmacologic inactivation of SHIP2 activity led to significant osteocalcin mRNA overexpression (Fig. 5C).

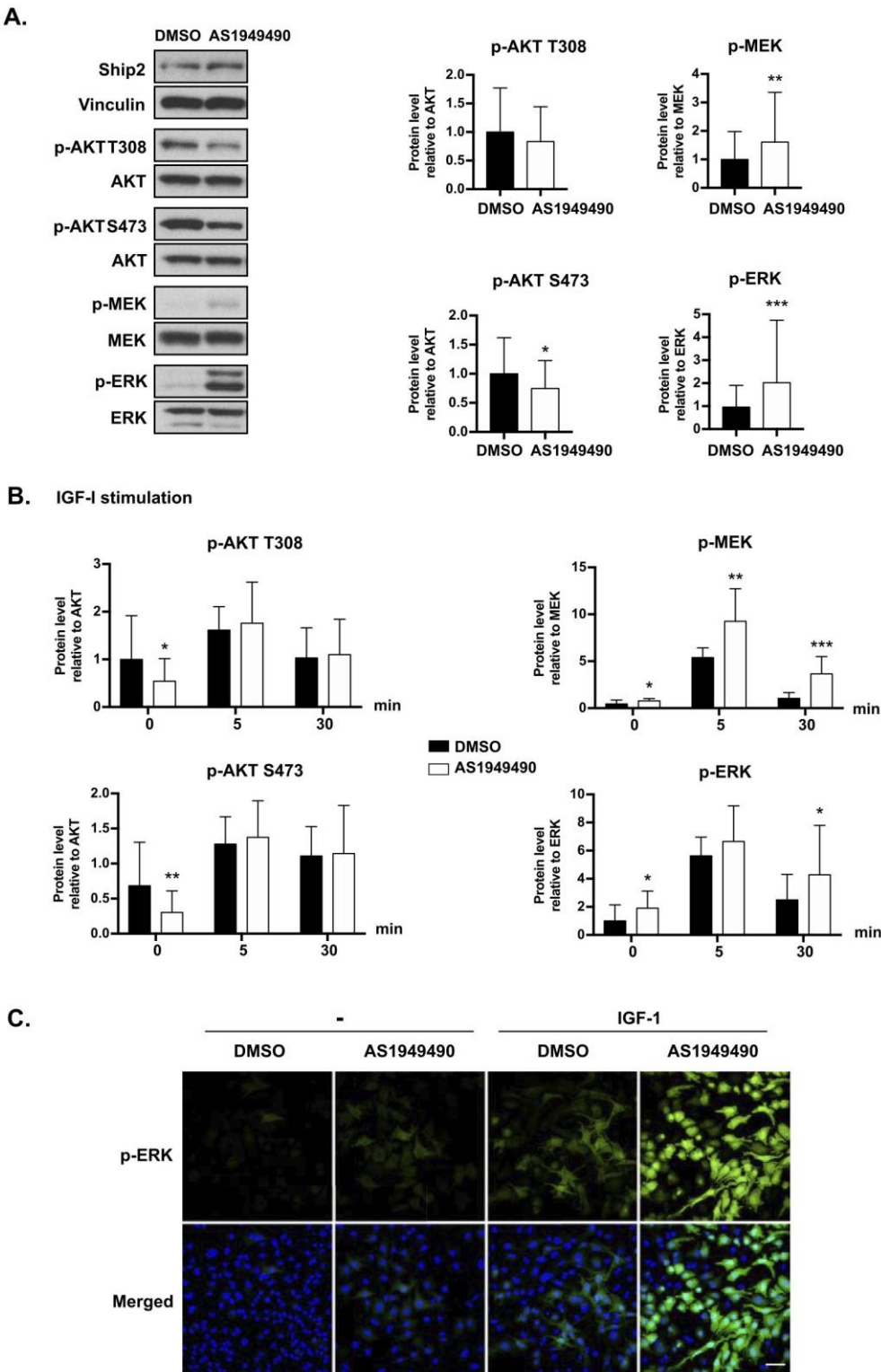
### 3.5. Targeting osteocalcin mRNA with specific shRNA in SHIP2-inactivated chondrocytes results in an increased matrix mineralization

In order to analyze the role of osteocalcin in the mineralization defect observed when SHIP2 is inactivated, ATDC5 chondrocyte micromass cultures were transduced with lentivirus expressing osteocalcin-specific or scrambled shRNAs and analyzed for mineralized nodules production. In initial experiments, we showed that more than 90% of ATDC5 chondrocytes were GFP positive after transduction with the different GFP-expressing lentiviral preparations (Supplementary Fig. 4A) and that two osteocalcin-specific shRNAs led to a significantly decreased level of the osteocalcin protein in chondrocytes (Supplementary Fig. 4B) and in the chondrocyte culture supernatant (Supplementary Fig. 4C), on the contrary to the scrambled shRNA. When transduced with an osteocalcin-specific shRNA-expressing lentivirus, SHIP2 inhibitor-treated ATDC5 cells produced significantly increased amounts of mineralized nodules, as compared with scrambled shRNA-expressing lentivirus (Fig. 6A). Similar results were observed in *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> chondrocyte micromass cultures after transduction with osteocalcin-specific shRNA- or scrambled shRNA-expressing lentivirus (Fig. 6B).

Together, our results indicate that SHIP2 inactivation in chondrocytes increased osteocalcin level and decreased production of mineralized nodules, and that targeting osteocalcin mRNA in these SHIP2-deficient chondrocytes with specific shRNAs increased matrix mineralization.



**Fig. 6. Targeting the osteocalcin mRNA with specific shRNA in SHIP2-inactivated chondrocytes results in a significant increase in matrix mineralization.** AS1949490 SHIP2 inhibitor-treated (5 μM, AS1949490) ATDC5 cell micromass (A) or *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> chondrocyte micromass (B) cultures were transduced with either a scrambled or an osteocalcin-specific (shOCN) shRNA-expressing lentivirus. After 28 days of culture, mineralized nodule formation (alizarin red S staining) was analyzed. Representative culture plates are presented along with spectrophotometric data. Results shown are representative of 4 independent experiments performed with lentivirus expressing two different osteocalcin-specific shRNAs. Graph shows mean value ± SD. Statistics (paired *t*-test): \*: *p* < 0.05.



(caption on next page)



**Fig. 7. Analysis of Akt and MAPK signaling pathways in SHIP2 inhibitor-treated chondrocytes.** **A.** Western blotting with antibodies directed against phospho- and total Akt<sup>T308</sup>, Akt<sup>S473</sup>, MEK and Erk1/2 proteins on extracts isolated from *Ship2*<sup>+/+</sup> chondrocytes treated (AS1949490) or not (DMSO) with the AS1949490 SHIP2 inhibitor. Graphs show mean values of phosphoproteins level relative to total Akt, MEK and Erk1/2 protein levels  $\pm$  SD. Statistics (paired t-test): \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ . **B.** *Ship2*<sup>+/+</sup> chondrocytes were treated (AS1949490) or not (DMSO) with the AS1949490 SHIP2 inhibitor and stimulated or not with 13 nM IGF1 for 5 and 30 min. Graphs show mean values of phosphoproteins level relative to total Akt, MEK and Erk1/2 proteins level  $\pm$  SD. Statistics (paired t-test): \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ . A representative Western blotting is presented in S5A Fig. **C.** Immunofluorescence analysis with an anti-Erk1/2 antibody (green) and DAPI (nuclei, blue) of *Ship2*<sup>+/+</sup> chondrocytes treated (AS1949490) or not (DMSO) with the AS1949490 SHIP2 inhibitor and stimulated or not with 13 nM IGF1 for 5 min. Scale bars: 40  $\mu$ m. Results shown are representative of 3 independent experiments.

### 3.6. SHIP2 inactivation in chondrocytes leads to increased activation of the MEK-Erk1/2 MAP kinase signaling pathway

In various cell types and models, it has been reported that SHIP2 controls Akt and MAPK signaling pathways in response to insulin, growth factors or serum (Sleeman et al., 2005; Juryneć et al., 2010; Dubois et al., 2012; Agollah et al., 2014; Faflek et al., 2018; Ramos et al., 2019). These two signaling pathways were analyzed with phospho antibodies directed against Akt (p-Akt<sup>T308</sup> and p-Akt<sup>S473</sup>), MEK (p-MEK) and Erk1/2 (p-Erk1/2). First, using Western blotting followed by immunodetection, it was observed that levels of p-MEK and p-Erk1/2, but not of p-Akt, were significantly increased in *Ship2*<sup>+/+</sup> chondrocytes cultured with serum in the presence of AS1949490, as compared with DMSO (Fig. 7A). Next, increased phosphorylation of Erk1/2 was also shown by immunofluorescence in serum-cultured *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> chondrocytes compared with *Ship2*<sup>+/+</sup> chondrocytes (Supplementary Fig. 5A), as well as in serum-cultured AS1949490-treated ATDC5 cells compared with DMSO-treated cells (Supplementary Fig. 5B). Finally, DMSO- and SHIP2 inhibitor-treated *Ship2*<sup>+/+</sup> chondrocytes were stimulated for 5 and 30 min with IGF1 or FGF2, two growth factors that are known to play an important role in chondrocyte differentiation during endochondral ossification (Su et al., 2008; Komori et al., 2011; Wang et al., 2014; Yang et al., 2017) and analyzed for MEK, Erk1/2 and Akt activation. A significantly increased phosphorylation of MEK and Erk1/2, but not of Akt, was observed by Western blotting and immunofluorescence when SHIP2 inhibitor-treated *Ship2*<sup>+/+</sup> chondrocytes were stimulated with IGF1, as compared to DMSO-treated cells (Fig. 7B and C and Supplementary Fig. 6A). By contrast, no significant effect was observed on Akt, MEK or Erk1/2 phosphorylations when SHIP2 inhibitor-treated *Ship2*<sup>+/+</sup> chondrocytes were stimulated with FGF2, as compared with DMSO-treated cells (Supplementary Fig. 6B).

Altogether, considering our Western blotting analysis and immunofluorescence data, it appeared that, in mouse chondrocytes, when SHIP2 is inactivated, the MEK-Erk1/2 MAP kinase signaling pathway was significantly and reproducibly upregulated in response to serum and IGF1, but not to FGF2.

### 3.7. Effects of MEK inhibition on *in vitro* mineralized nodules production and on *ex vivo* metatarsal bone growth defects resulting from SHIP2 inhibition

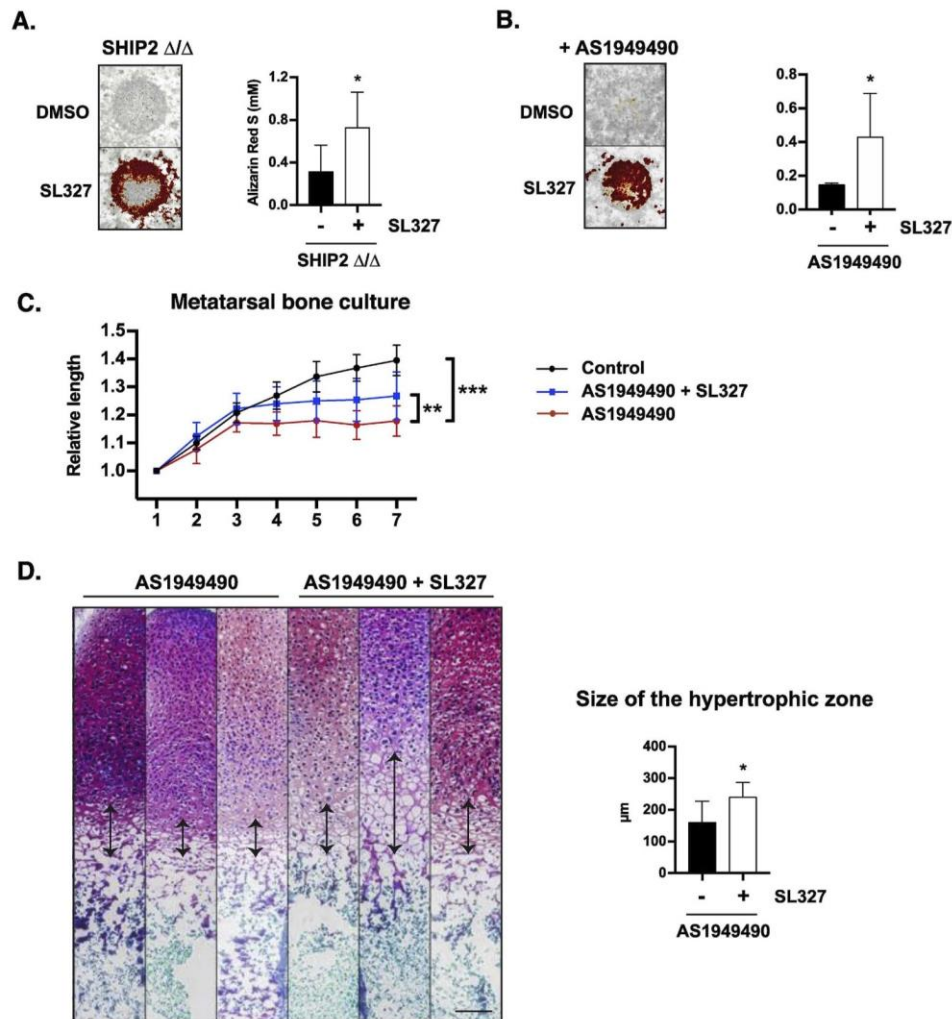
Since genetic and pharmacologic inactivation of SHIP2 in chondrocytes resulted in increased serum- and IGF1-stimulated Erk1/2 activation, the effect of MEK inhibition was tested on *in vitro* mineralized nodules production and on *ex vivo* metatarsal bone growth. First, the minimal concentration of SL327 MEK inhibitor that restored in SHIP2 inhibitor-treated *Ship2*<sup>+/+</sup> chondrocytes a level of Erk1/2 phosphorylation similar to DMSO-treated chondrocytes was identified as about 2  $\mu$ M (Supplementary Fig. 7). Next, when *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> chondrocyte micromass cultures were incubated with 2  $\mu$ M SL327 MEK inhibitor, the production of mineralized nodules was significantly increased, as compared with DMSO-treated *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> cells (Fig. 8A). Similar results were obtained in SHIP2 inhibitor-treated chondrocytes when incubated with 2  $\mu$ M SL327 MEK inhibitor (Fig. 8B). Finally, when SHIP2 inhibitor-treated metatarsal bones were cultured in the presence of 2  $\mu$ M SL327 MEK inhibitor, a significant increase in metatarsal bone growth (Fig. 8C) and in the size of the metatarsal hypertrophic zone (Fig. 8D) were observed, as compared with bones treated with the SHIP2 inhibitor only.

Altogether, these results indicate that targeting with a MEK inhibitor the overactivated MEK-Erk1/2 signaling pathway in SHIP2-inactivated chondrocytes resulted in an increased production of mineralized nodules *in vitro* and an increased metatarsal bone growth and hypertrophic zone size *ex vivo*.

## 4. Discussion

The mechanism leading to OPS, a severe skeletal chondrodysplasia characterized by growth plate defects and delayed bone maturation, is currently unknown. Furthermore, the variability of clinical, radiological and histological manifestations in this rare disease is high (Cormier-Daire et al., 2004; Below et al., 2013; Huber et al., 2013; Iida et al., 2013), and not all patients have *Inpp1* variants, suggesting that OPS exhibits genetic heterogeneity (Below et al., 2013; Iida et al., 2013). Animal models where SHIP2 is genetically inactivated have been reported in mouse and zebrafish, but they have never been specifically analyzed for bone maturation (Sleeman et al., 2005; Juryneć et al., 2010; Dubois et al., 2012). We used here our *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> mouse expressing reduced amount of a catalytically-inactive SHIP2 truncated protein to investigate growth plate development and mineralization. As observed in OPS patients, catalytic inactivation of SHIP2 in mouse leads to reduced body length, shortening of long bones, craniofacial dysmorphism, reduced height of the hypertrophic chondrocytes zone and to defects in growth plate mineralization. However, in our *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> mouse, the diminished body and bone growth is relatively mild in severity and no cellular architectural alteration was detected in the resting and the proliferative zones. This is in contrast to OPS in humans (Tyler et al., 1999; Cormier-Daire et al., 2004; Huber et al., 2013). These phenotypic differences between human and mouse OPS may reflect interspecies variations, the scarcity and





**Fig. 8. MEK inhibition increases mineralized nodules production by chondrocytes and metatarsal bone growth after SHIP2 inactivation.** *Ship2* $\Delta/\Delta$  (A) and AS1949490 SHIP2 inhibitor-treated (10  $\mu\text{M}$ , AS1949490) *Ship2* $^{+/+}$  (B) chondrocyte micromass cultures were incubated (SL327) or not (control) with 2  $\mu\text{M}$  SL327 MEK inhibitor. After 8 days of culture, mineralized nodule formation (alizarin red S staining) was analyzed. Representative culture plates are presented along with spectrophotometric data. Results shown are representative of 3 experiments. Graph shows mean value  $\pm$  SD. Statistics (*t*-test): \*:  $p < 0.05$ . C. Second metatarsal bones were isolated from 3 day-old *Ship2* $^{+/+}$  mice and cultured for 7 days in the presence of DMSO (control), 10  $\mu\text{M}$  AS1949490 SHIP2 inhibitor (AS1949490) or 10  $\mu\text{M}$  AS1949490 SHIP2 inhibitor and 1  $\mu\text{M}$  SL327 MEK inhibitor (AS1949490 + SL327). Each day, bone length was determined by microscopy quantification. Metatarsal bone length, relative to DMSO-treated metatarsal bone length at day 1, is presented as mean  $\pm$  SD. Results are representative of 3 independent experiments. Statistics (2-way ANOVA test): \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ . D. Safranin O and Fast-Green staining of metaphyseal growth plate sections from metatarsals at the same relative position through the joint after 7 days in culture in the presence of the SHIP2 inhibitor alone (AS1949490) or the SHIP2 inhibitor and the MEK inhibitor (AS1949490 + SL327). The arrows indicate the size of the HZ. Scale bars: 100  $\mu\text{m}$ . The graph shows mean value  $\pm$  SD of the hypertrophic zone size. Metatarsal bones of 6 mice per group were analyzed. Statistics (*t*-test): \*:  $p < 0.05$ .

the variability of histological observations reported in OPS patients and/or the precise nature of the *Inpp1* mutations in man and mouse. Indeed, in *Ship2* $\Delta/\Delta$  mice, only exons 18 and 19 of the *Inpp1* gene are deleted, resulting in the decreased expression of a 57 amino acid-truncated SHIP2 protein, as compared with *Ship2* $^{+/+}$  mice expressing a 1257 amino acids wild type SHIP2 protein. Removal of this 57 amino acid-region certainly results in a catalytically-inactive Ship2 protein, as predicted by the literature and measured by a phosphate release assay using  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  as a substrate (Dubois et al., 2012). However, the effect of this specific truncation on the binding to SHIP2 interacting partners was not investigated, preventing any conclusion on the role of SHIP2 docking properties in OPS pathology. By contrast, in human OPS, the majority of mutations either creates a stop codon directly or results in a downstream stop codon. These mutations are predicted to result either in a null allele after nonsense-mediated mRNA decay or in a null catalytic activity (Below et al., 2013; Huber et al., 2013; Iida et al., 2013; Fradet and Fitzgerald, 2017). *Inpp1* missense mutations have also been detected in human OPS: they are located in the catalytic domain and presumably inactivate the 5-phosphatase



function of the SHIP2 protein (Below et al., 2013; Huber et al., 2013; Iida et al., 2013; Fradet and Fitzgerald, 2017). Again, the effect of these SHIP2 mutations detected in OPS patients on the binding to SHIP2 protein partners was not investigated. Nor was it investigated on the SHIP2 protein incubated with the AS1949490 SHIP2 inhibitor which reproduces in this study most if not all alterations detected after Ship2 genetic inactivation. Altogether, the high phenotypic variability within human OPS patients and with murine OPS may be due to the diversity of the mutations involved and their effects on the persistence (or not) of a truncated/mutated SHIP2 protein and on the binding to SHIP2 protein partners. It is noteworthy here that the complete absence of SHIP2 protein expression in Sleeman's *Ship2* knock-out mice did not show a severe skeletal phenotype either (Sleeman et al., 2005). An alternative hypothesis is that the severity of the disease is a consequence of a deleterious ratio between the many different phosphatases and kinases which finally control phosphoinositides levels in a specific cell type, like chondrocytes in our case. Thus, the inactivation of a single phosphatase or kinase in different species may result in a small difference in the ratio between the different phosphoinositide levels in a given cell type but in a significant difference in the severity of the phenotype. An extreme example of this concept is OCRL: inactivating mutations in this 5-phosphatase result in the Lowe syndrome in man but in no obvious phenotype in mouse (Jänne et al., 1998).

One noteworthy result in our study is the confirmation that SHIP2 plays an important role during endochondral ossification: growth plate histology and mineralization are both affected in human and mouse OPS. These alterations can be the consequence of SHIP2 inactivation in many cell types, both outside and/or inside the bone. Our results revealed that intrinsic *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> bone defects are sufficient to induce characteristic OPS alterations in bone growth, histology and mineralization *ex vivo*. Thus, SHIP2 inactivation in cells residing outside the growing bone does not seem to play a major role in the OPS phenotype, reinforcing the hypothesis that bone cells including osteoprogenitor cells, osteoblasts, osteoclasts and/or chondrocytes are essential in OPS. Since in *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> mice no obvious alteration was detected in cortical bone thickness, a parameter that is highly dependent on membranous ossification and, on the contrary to endochondral ossification, does not implicate chondrocytes, we decided to concentrate our analyses on chondrocytes in this study. Unfortunately, attempts to investigate if SHIP2 inactivation specifically in chondrocytes is sufficient to recapitulate the skeletal OPS phenotype failed, due to an unexplained low level of *Ship2* gene recombination *in vivo* and the consecutive persistence of a large amount of the wild type SHIP2 protein in chondrocytes of *SHIP2*<sup>lox/lox</sup> Cre mice. Thus, we cannot exclude that alteration in other bone cells than chondrocytes also contribute to OPS pathology.

A second important and unexpected result in our study is the demonstration that osteocalcin plays an essential role in the mineralization defect observed *in vitro* in chondrocytes when SHIP2 is inactivated and, possibly, in murine OPS. Indeed, expression of osteocalcin is significantly increased in different models of SHIP2-inactivated chondrocyte cultures whereas production of mineralized nodules is systematically and markedly decreased. Targeting osteocalcin mRNA in cultured chondrocytes with specific shRNA increased the production of mineralized nodules. These results are in agreement with results obtained in osteocalcin knock-out mice which lack both osteocalcin genes expressed in the bone (Ducy et al., 1996). Indeed, in these osteocalcin null mice, the absence of osteocalcin is associated with increased bone formation rate, bone mass and mineral to matrix ratio, as well as with larger hydroxyapatite crystal size, i.e. the opposite phenotype observed in cultured chondrocytes lacking SHIP2. Interestingly, the osteoblast overexpression of osteocalcin in  $\alpha 1(I)Col$ -Osteocalcin transgenic mice had no effect on bone mineralization (Murshed et al., 2004), suggesting that chondrocyte-specific - and not osteoblast-specific - overexpression of osteocalcin is responsible for the decreased mineralization observed in the absence of SHIP2 in our *in vivo* and *in vitro* models. Since both osteopontin and osteocalcin are inhibitors of bone mineralization (Bailey et al., 2017), the finding that osteopontin mRNA and protein levels are also increased in SHIP2-inactivated chondrocyte cultures reinforce the argument that loss of SHIP2 results in mineralization defect.

Finally, a third important result in our study is the role of the MEK-Erk1/2 signaling pathway in the OPS phenotype. Indeed, levels of p-MEK and p-Erk1/2 are significantly increased in SHIP2-inactivated chondrocytes in response to serum and IGF-1, but not to FGF2, as compared with control chondrocytes. Furthermore, treatment of SHIP2-inactivated chondrocytes and bones with a MEK inhibitor *partially* rescues the production of mineralized nodules, the size of the hypertrophic chondrocytes zone and bone growth, raising the possibility and the hope of a treatment that could *partially* reduce the phenotype of this rare but severe condition. Constitutive activation of MEK-Erk1/2 signaling pathway in chondrocytes is known to cause dwarfism in transgenic mice, with similar defects in growth plate differentiation as observed in *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> mice (Murakami et al., 2004). Indeed, transgenic mice that express a constitutively active mutant of MEK1 specifically in chondrocytes show increased phosphorylation of Erk1/2, shortened axial and appendicular skeleton, craniofacial dysmorphism with a round skull and shortened snout, delayed bone mineralization and reduction of the hypertrophic chondrocyte zone, all very similar to *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> mice. Chondrocyte proliferation and the proliferative zone are not affected in these MEK1 transgenic mice (Murakami et al., 2004). Despite the fact that activating mutations in FGF receptor 3 (FGFR3) also cause a similar short-limbed dwarfism with similar growth plate alterations in man and mouse (Su et al., 2008, 2010), we found no evidence for increased MEK-Erk1/2 phosphorylation in SHIP2-inactivated chondrocytes in response to FGF2. By contrast, IGF-1 stimulation of SHIP2-inactivated chondrocytes reproduced the MEK-Erk1/2 overactivation observed with serum stimulation. IGF-1 has been reported to control key signaling pathways and differentiation steps during endochondral ossification, particularly in hypertrophic chondrocytes (Cooper et al., 2013; Wang et al., 2014; Yang et al., 2017). Many studies in the literature clearly indicate that SHIP2 inhibition may lead to MAPK overactivation in response to growth factors or that, alternatively, SHIP2 overexpression may lead to reduce MAPK activation (Blero et al., 2001; Sasaoka et al., 2003; Kagawa et al., 2005; Artemenko et al., 2009; Jurynek et al., 2010; Dubois et al., 2012; Agollah et al., 2014; Faflek et al., 2018). Several hypotheses have been proposed and include non-catalytic and catalytic mechanisms. First, SHIP2 might function through its SH2 domain to compete with and displace molecules such as Shc and Grb2 from the activated receptor tyrosine kinase, and thereby reduce the number of active signaling complexes (Sasaoka et al., 2003; Kagawa et al., 2005). Similarly, functional studies on SHIP1, which is homologous to SHIP2, have shown that this 5-phosphatase negatively regulates MAPK through inhibition of the binding of a Grb2/SOS Ras guanine



nucleotide exchange factor complex to the Shc adapter protein, which is an event that is necessary for Ras activation (Tridandapani et al., 1997; Sharma et al., 2005). Second, about the catalytic regulation of MAPK by SHIP2, PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> could potentially lead to membrane recruitment of pleckstrin homology (PH) domain-containing proteins other than Akt that subsequently amplify growth factor-induced activation of Ras, as reported for antigen receptor signaling in lymphocytes (Readinger et al., 2009) and suggested for HGF and VEGF receptors in lymphatic endothelial cells (Agollah et al., 2014).

Many studies have established that SHIP2 negatively influences Akt activity, essentially by recognizing PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> as a substrate (Ramos et al., 2018, 2019). However, the impact of SHIP2 on Akt activity is very much cell type-dependent: in the colorectal cancer HCT116 cell line, Akt phosphorylation was reduced when SHIP2 expression was decreased, without any change in cell proliferation (Hoekstra et al., 2016). When cultured fibroblasts derived from OPS patients were stimulated during 5 min by EGF, p-PKB<sup>S473</sup> was also decreased as compared to non-affected individuals (Ghosh et al., 2017). In SHIP2-inactivated chondrocytes, p-Akt on S473 and T311 was not increased when stimulated with serum, IGF-1 or FGF2, as compared with control chondrocytes. This result is in agreement with the fact that Akt deletion in knock-out mice - but not Akt overexpression or overactivation - is associated with severe dwarfism and delayed bone ossification (Peng et al., 2003; Ulici et al., 2009).

In conclusion, our results indicate that *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> mice represent a relevant model for human OPS. They also highlight the important role of SHIP2 in chondrocytes during endochondral ossification and its different differentiation steps. A role of osteocalcin in mineralized nodules production is firmly established. Finally, our data point out to a role of the MEK-Erk1/2 signaling pathway in the OPS phenotype as observed in our mice model.

### Funding

This work was supported by grants from the University of Liège (grant FRS #RCFRA3043 to SS and a grant from the Fondation Léon Fredericq (to CAVC)) and by a grant from the Fonds AMIR (IRIBHM, Université Libre de Bruxelles, to CAVD). CAVC and BM are PhD students of the Belgian FRS-FNRS-FRIA. DC is a senior research associate of the Belgian FRS-FNRS.

The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

### Acknowledgments

We thank Prof. N. Antoine (Université de Liège) for helpful discussions, Aurore Cué-Alvarez (Laboratory of Functional Genetics) for technical help and mice genotyping, and the GIGA platforms (mouse facility, viral vector, imaging and immunohistology) for their technical support.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2019.100651>.

### References

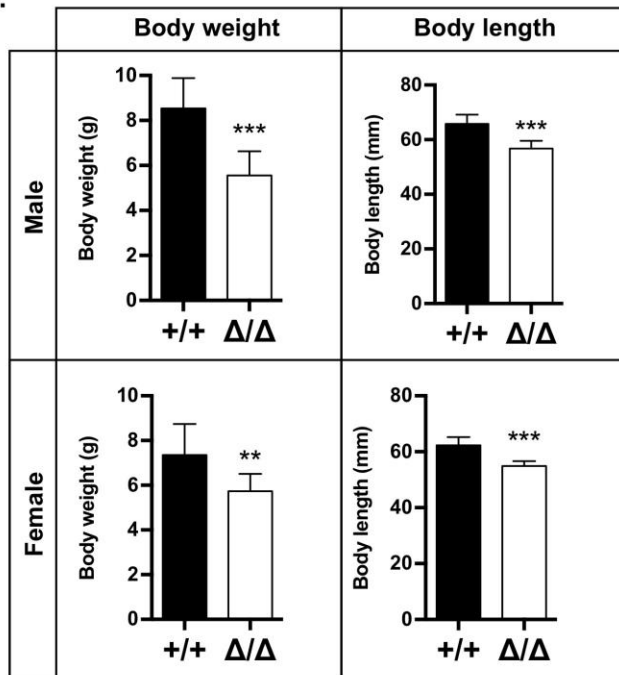
- Agollah, G.D., Gonzalez-Garay, M.L., Rasmussen, J.C., Tan, I.C., Aldrich, M.B., Darne, C., Fife, C.E., Guilliard, R., Maus, E.A., King, P.D., Sevcik-Muraka, E.M., 2014. Evidence for SH2 domain-containing 5'-inositol phosphatase-2 (SHIP2) contributing to a lymphatic dysfunction. *PLoS One* 9, e112548. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112548>.
- Artemenko, Y., Gagnon, A., Sorisky, A., 2009. Catalytically inactive SHIP2 inhibits proliferation by attenuating PDGF signaling in 3T3-L1 preadipocytes. *J. Cell. Physiol.* 218, 228–236.
- Bailey, S., Karsenty, G., Gundberg, C., Vashishth, D., 2017. Osteocalcin and osteopontin influence bone morphology and mechanical properties. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1409, 79–84.
- Beemer, F.A., Kozlowski, K.S., 1994. Additional case of opsismodysplasia supporting autosomal recessive inheritance. *Am. J. Med. Genet.* 49, 344–347.
- Below, J.E., Earl, D.L., Shively, K.M., McMillin, M.J., Smith, J.D., Turner, E.H., Stephan, M.J., Al-Gazali, L.I., Hertecant, J.L., Chitayat, D., Unger, S., Cohn, D.H., Krakow, D., Swanson, J.M., Faustman, E.M., Shendure, J., Nickerson, D.A., Bamshad, M.J., 2013. Whole-genome analysis reveals that mutations in inositol polyphosphate phosphatase-like 1 cause opsismodysplasia. *Am. J. Hum. Genet.* 92, 137–143.
- Blero, D., De Smedt, F., Pesesse, X., Paternotte, N., Moreau, C., Payrastra, B., Erneux, C., 2001. The SH2 domain containing inositol 5-phosphatase SHIP2 controls phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate levels in CHO-IR cells stimulated by insulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282, 839–843.
- Cooper, K.L., Oh, S., Sung, Y., Dasari, R.R., Kirschner, M.W., Tabin, C.J., 2013. Multiple phases of chondrocyte enlargement underlie differences in skeletal proportions. *Nature* 495, 375–378.
- Cormier-Daire, V., Delezoide, A.L., Philip, N., Marcotelles, P., Casas, K., Hillion, Y., Faivre, L., Rimoin, D.L., Munnich, A., Maroteaux, P., Le Merrer, M., 2003. Radiological, and chondro-osseous findings in opsismodysplasia: survey of a series of 12 unreported cases. *J. Med. Genet.* 40, 195–200.
- Dubois, E., Jacoby, M., Blockmans, M., Pernot, E., Schiffmann, S.N., Foukas, L.C., Henquin, J.C., Vanhaesebroeck, B., Erneux, C., Schurmans, S., 2012. Developmental defects and rescue from glucose intolerance of a catalytically-inactive novel *Ship2* mutant mouse. *Cell. Signal.* 24, 1971–1980.
- Ducy, P., Desbois, C., Boyce, B., Pinero, G., Story, B., Dunstan, C., Smith, E., Bonadio, J., Goldstein, S., Gundberg, C., Bradley, A., Karsenty, G., 1996. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382, 448–452.
- Dyson, J.M., Fedele, C.G., Davies, E.M., Becanovic, J., Mitchell, C.A., 2012. Phosphoinositide phosphatases: just as important as the kinases. *Subcell. Biochem.* 58, 215–279.
- Elong Edimo, W., Schurmans, S., Roger, P.P., Erneux, C., 2014. SHIP2 signaling in normal and pathological situations: its impact on cell proliferation. *Adv Biol Regul* 54, 142–151.
- Elong Edimo, W., Ghosh, S., Derua, R., Janssens, V., Waelkens, E., Vanderwinden, J.M., Robe, P., Erneux, C., 2016. SHIP2 controls plasma membrane PI(4,5)P<sub>2</sub> thereby participating in the control of cell migration in 1321 N1 glioblastoma cells. *J. Cell Sci.* 129, 1101–1114.
- Fafilek, B., Balek, L., Bosakova, M.K., Varecha, M., Nita, A., Gregor, T., Gudernova, I., Krenova, J., Ghosh, S., Piskacek, M., Jonatova, L., Cernohorsky, N.H., Zieba, J.T., Kostas, M., Haugsten, E.M., Wesche, J., Erneux, C., Trantirek, L., Krakow, D., Krejci, P., 2018. The inositol phosphatase SHIP2 enables sustained ERK activation downstream of FGF receptors by recruiting Src kinases. *Sci. Signal.* 11 (548), eaap8608. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aap8608>. pii.
- Fradet, A., Fitzgerald, J., 2017. INPPL1 gene mutations in opsismodysplasia. *J. Hum. Genet.* 62, 135–140.



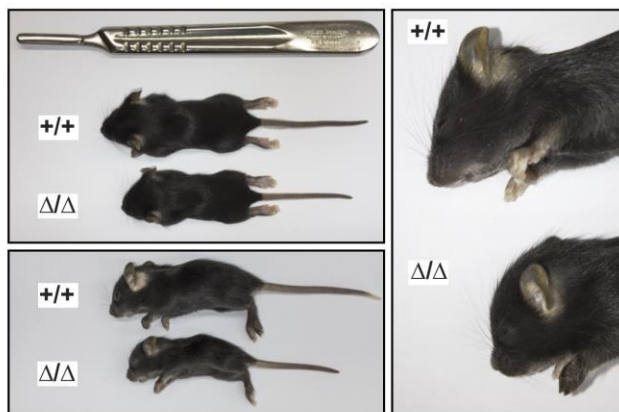
- Ghosh, S., Huber, C., Siour, Q., Sousa, S.B., Wright, M., Cormier-Daire, V., Erneux, C., 2017. Fibroblasts derived from patients with opsismodysplasia display SHIP2-specific cell migration and adhesion defects. *Hum. Mutat.* 38, 1731–1739.
- Giuriato, S., Blero, D., Robaye, B., Bruyns, C., Payrastra, B., Erneux, C., 2002. SHIP2 overexpression strongly reduces the proliferation rate of K562 erythroleukemia cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296, 106–110.
- Hakim, S., Bertucci, M.C., Conduit, S.E., Vuong, D.L., Mitchell, C.A., 2012. Inositol polyphosphate phosphatases in human disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 362, 247–314.
- Hoekstra, E., Das, A.M., Willemsen, M., Swets, M., Kuppen, P.J., van der Woude, C.J., Bruno, M.J., Shah, J.P., ten Hagen, T.L.M., Chisholm, J.D., Kerr, W.G., Peppelenbosch, M.P., Fuhler, G.M., 2016. Lipid phosphatase SHIP2 functions as oncogene in colorectal cancer by regulating PKB activation. *Oncotarget* 7, 73525–73540.
- Huber, C., Faqeh, E.A., Bartholdi, D., Bole-Feysot, C., Borochowitz, Z., Cavalcanti, D.P., Frigo, A., Nitschke, P., Roume, J., Santos, H.G., Shalev, S.A., Superti-Furga, A., Delezoide, A.L., Le Merrer, M., Munnich, A., Cormier-Daire, V., 2013. Exome sequencing identifies INPPL1 mutations as a cause of opsismodysplasia. *Am. J. Hum. Genet.* 92, 144–149.
- Iida, A., Okamoto, N., Miyake, N., Nishimura, G., Minami, S., Sugimoto, T., Nakashima, M., Tsurusaki, Y., Saito, H., Shiina, M., Ogata, K., Watanabe, S., Ohashi, H., Matsumoto, N., Ikegawa, S., 2013. Exome sequencing identifies a novel INPPL1 mutation in opsismodysplasia. *J. Hum. Genet.* 58, 391–394.
- Jänne, P.A., Suchy, S.F., Bernard, D., MacDonald, M., Crawley, J., Grinberg, A., Wynshaw-Boris, A., Westphal, H., Nussbaum, R.L., 1998. Functional overlap between murine Inpp5b and Ocr1l may explain why deficiency of the murine ortholog for OCRL1 does not cause Lowe syndrome in mice. *J. Clin. Investig.* 101, 2042–2053.
- Jonason, J.H., Hoak, D., O'Keefe, R.J., 2015. Primary murine growth plate and articular chondrocyte isolation and cell culture. *Osteoporosis and osteoarthritis. Methods Mol. Biol.* 1226, 11–18.
- Jurynek, M.J., Grunwald, D.J., 2010. SHIP2, a factor associated with diet-induced obesity and insulin sensitivity, attenuates FGF signaling in vivo. *Dis Model Mech* 3, 733–742.
- Kagawa, S., Sasaoka, T., Yaguchi, S., Ishiara, H., Tsuneki, H., Murakami, S., Fukui, K., Wada, T., Kobayashi, S., Kimura, I., Kobayashi, M., 2005. Impact of SRC homology 2-containing inositol 5'-phosphatase 2 gene polymorphisms detected in a Japanese population on insulin signaling. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 2911–2919.
- Komori, T., 2011. Signaling networks in RUNX2-dependent bone development. *J. Cell. Biochem.* 112, 750–755.
- Maroteaux, P., Stanescu, V., Stanescu, R., Le Marec, B., Moraine, C., Lejarraga, H., 1984. Opsismodysplasia: a new type of chondrodysplasia with predominant involvement of the bones of the hand and the vertebrae. *Am. J. Med. Genet.* 19, 171–182.
- Muraille, E., Dassel, D., Vanderwinden, J.M., Cremer, H., Rogister, B., Erneux, C., Schiffmann, S.N., 2001. The SH2 domain-containing 5-phosphatase SHIP2 is expressed in the germinal layers of embryo and adult mouse brain: increased expression in N-CAM-deficient mice. *Neuroscience* 105, 1019–1030.
- Murakami, S., Balmes, G., McKinney, S., Zhang, Z., Givol, D., de Crombrughe, B., 2004. Constitutive activation of MEK1 in chondrocytes causes Stat1-independent achondroplasia-like dwarfism and rescues the Fgfr3-deficient mouse phenotype. *Genes Dev.* 18, 290–305.
- Murshed, M., Schinke, T., McKee, M.D., Karsenty, G., 2004. Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins. *J. Cell Biol.* 165, 625–630.
- Peng, X.D., Xu, P.Z., Chen, M.L., Hahn-Windgassen, A., Skeen, J., Jacobs, J., Sundararajan, D., Chen, W.S., Crawford, S.E., Coleman, K.G., Hay, N., Dwarfism, 2003. Impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes Dev.* 17, 1352–1365.
- Ramos, A.R., Elong Edimo, W., Erneux, C., 2018. Phosphoinositide 5-phosphatase activities control cell motility in glioblastoma: two phosphoinositides PI(4,5)P2 and PI(3,4)P2 are involved. *Adv Biol Regul* 67, 40–48.
- Ramos, A.R., Ghosh, S., Erneux, C., 2019. The impact of phosphoinositide 5-phosphatases on phosphoinositides in cell function and human disease. *J. Lipid Res.* 60, 276–286.
- Readinger, J.A., Mueller, K.L., Venegas, A.M., Horai, R., Schwartzberg, P.L., 2009. Tec kinases regulate T-lymphocyte development and function: new insights into the roles of Itk and Rlk/Txk. *Immunol. Rev.* 228, 93–114.
- Sasaoka, T., Kikuchi, K., Wada, T., Sato, A., Hori, H., Murakami, S., Fukui, K., Ishihara, H., Aota, R., Kimura, I., Kobayashi, M., 2003. Dual role of SRC homology domain 2-containing inositol phosphatase 2 in the regulation of platelet-derived growth factor and insulin-like growth factor I signaling in rat vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* 144, 4204–4214.
- Schurmans, S., Carrió, R., Behrends, J., Pouillon, V., Merino, J., Clément, S., 1999. The mouse SHIP2 (Inpp1l) gene: complementary DNA, genomic structure, promoter analysis, and gene expression in the embryo and adult mouse. *Genomics* 62, 260–271.
- Seriwatanachai, D., Krishnamra, N., Charoenphandhu, N., 2012. Chondroregulatory action of prolactin on proliferation and differentiation of mouse chondrogenic ATDC5 cells in 3-dimensional micromass cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 420, 108–113.
- Sharma, P.M., Son, H.S., Ugi, S., Ricketts, W., Olefsky, J.M., 2005. Mechanism of SHIP-mediated inhibition of insulin- and platelet-derived growth factor-stimulated mitogen-activated protein kinase activity in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Endocrinol.* 19, 421–430.
- Sleeman, M.W., Wortley, K.E., Lai, K.M., Gowen, L.C., Kintner, J., Kline, W.O., Garcia, K., Stitt, T.N., Yancopoulos, G.D., Wiegand, S.J., Glass, D.J., 2005. Absence of the lipid phosphatase SHIP2 confers resistance to dietary obesity. *Nat. Med.* 11, 199–205.
- Su, N., Du, X., Chen, L., 2008. FGF signaling: its role in bone development and human skeleton diseases. *Front. Biosci.* 13, 2842–2865.
- Su, N., Sun, Q., Li, C., Lu, X., Qi, H., Chen, S., Yang, J., Du, X., Zhao, L., He, Q., Jin, M., Shen, Y., Chen, D., Chen, L., 2010. Gain-of-function mutation in FGFR3 in mice leads to decreased bone mass by affecting both osteoblastogenesis and osteoclastogenesis. *Hum. Mol. Genet.* 19, 1199–1210.
- Suwa, A., Kurama, T., Shimokawa, T., 2010. SHIP2 and its involvement in various diseases. *Expert Opin. Ther. Targets* 14, 727–737.
- Thirion, S., Berenbaum, F., 2004. Culture and phenotyping of chondrocytes in primary culture. *Methods Mol. Med.* 100, 1–14.
- Thomas, M.P., Erneux, C., Potter, B.V., 2017. SHIP2: structure, function and inhibition. *ChemBiochem* 18, 233–247.
- Tridandapani, S., Kelley, T., Cooney, D., Pradhan, M., Coggeshall, K.M., 1997. Negative signaling in B cells: SHIP grbs Shc. *Immunol. Today* 18, 424–427.
- Tyler, K., Sarioglu, N., Kunze, J., 1999. Five familial cases of opsismodysplasia substantiate the hypothesis of autosomal recessive inheritance. *Am. J. Med. Genet.* 83, 47–52.
- Ulici, V., Hoenselaar, K.D., Agoston, H., McErlain, D.D., Umoh, J., Chakrabarti, S., Holdsworth, D.W., Beier, F., 2009. The role of Akt1 in terminal stages of endochondral bone formation: angiogenesis and ossification. *Bone* 45, 1133–1145.
- Wang, Y., Menendez, A., Fong, C., ElAlieh, H.Z., Chang, W., Bikle, D.D., 2014. Ephrin B2/EphB4 mediates the actions of IGF-I signaling in regulating endochondral bone formation. *J. Bone Miner. Res.* 29, 1900–1913.
- Yang, Z.Q., Zhang, H.L., Duan, C.C., Geng, S., Wang, K., Yu, H.F., Yue, Z.P., Guo, B., 2017. IGF1 regulates RUNX1 expression via IRS1/2: implications for antler chondrocyte differentiation. *Cell Cycle* 16, 522–532.
- Zhang, J., Liu, Z., Rasschaert, J., Blero, D., Deneubourg, L., Schurmans, S., Erneux, C., Pesesse, X., 2007. SHIP2 controls PtdIns(3,4,5)P(3) levels and PKB activity in response to oxidative stress. *Cell. Signal.* 19, 2194–2200.

## Supplementary Figure 1

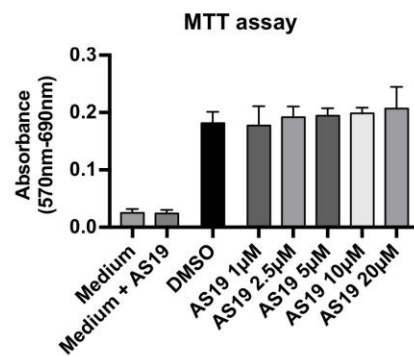
A.



B.

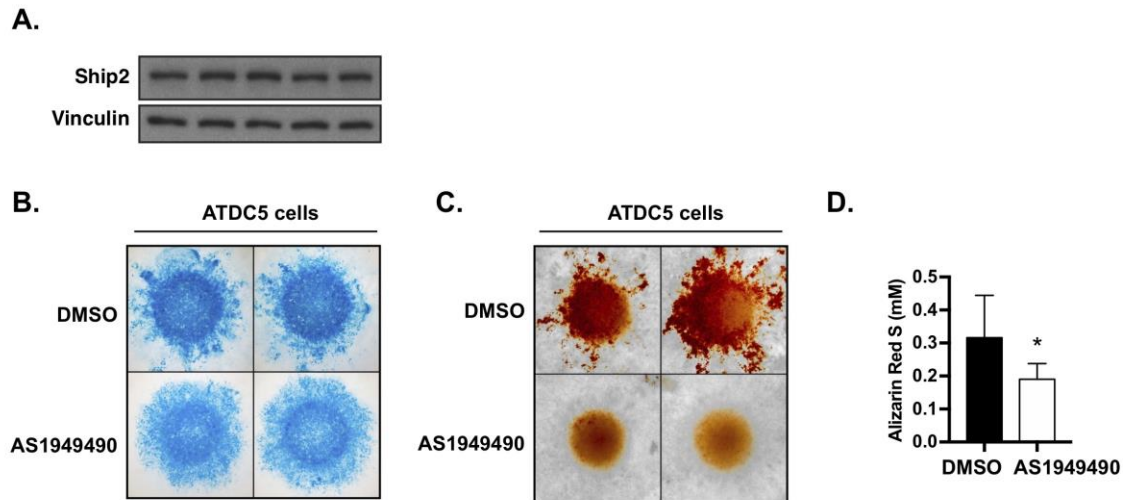


**Supplementary Figure 1: Developmental alterations in *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> mice.** **A.** Mean and SD of body weight and body length in 3 week-old male and female *Ship2*<sup>+/+</sup> and *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> mice, 5 to 12 mice per group. Statistics (t-test): \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ . **B.** Representative image of 3 week-old male *Ship2*<sup>+/+</sup> and *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> mice: the *Ship2*<sup>Δ/Δ</sup> mouse is shorter than the *Ship2*<sup>+/+</sup> mouse (left panels) and has a round skull with a shortened snout (right panel).

**Supplementary Figure 2****A.**

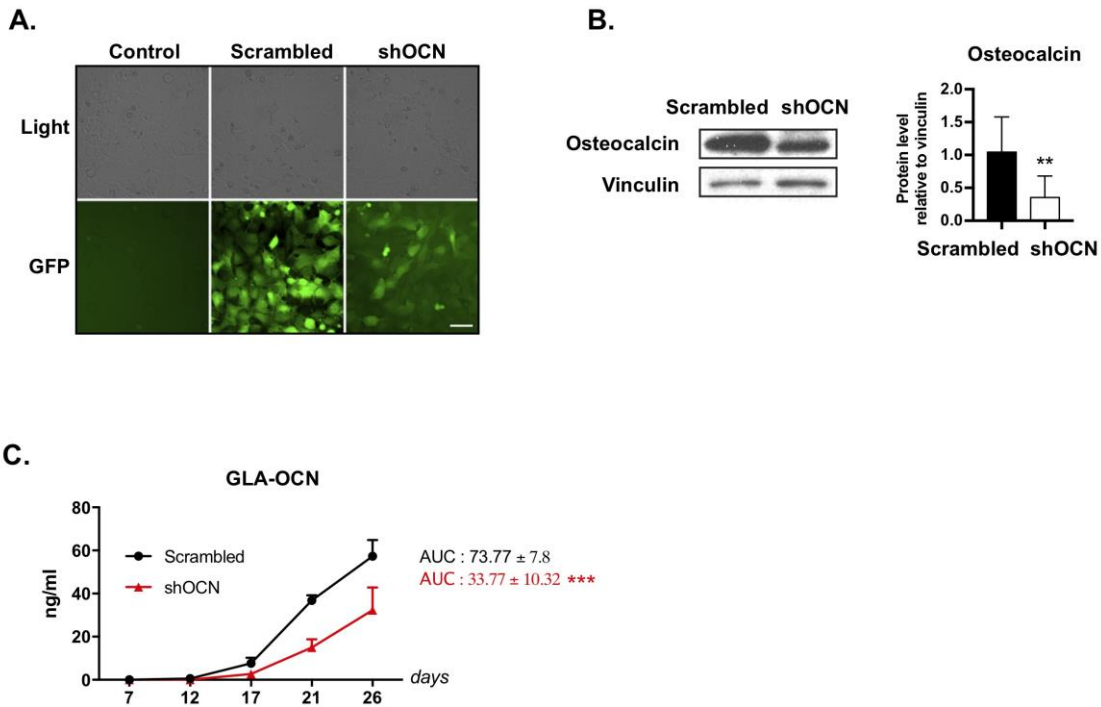
**Supplementary Figure 2: Effects of the AS1949490 SHIP2 inhibitor on *SHIP2*<sup>+/+</sup> primary chondrocytes viability.** Culture medium or *SHIP2*<sup>+/+</sup> primary chondrocytes isolated from 3 day-old mouse thoracic cartilage were incubated with 1-20 µM AS1949490 (AS19) SHIP2 inhibitor or DMSO for 5 days. Cell viability was analyzed in a MTT assay and results were expressed as mean of absorbance values  $\pm$  SD.

### Supplementary Figure 3



**Supplementary Figure 3: Pharmacologic inhibition of SHIP2 decreases mineralized nodules formation in ATDC5 cell micromass culture.** **A.** Western blotting with a SHIP2 antibody on protein extracts from 5 cell preparations isolated from 3 day-old mouse thoracic cartilage. Vinculin served as loading control. Glycosaminoglycans accumulation (Alcian blue staining, **B**) and mineralized nodule formation (alizarin red S staining, **C**) in micromass culture of ATDC5 cells treated (AS1949490) or not (control) with 5  $\mu$ M AS1949490 SHIP2 inhibitor. Two representative culture plates after 28 days of culture are presented along with spectrophotometric data (**D**). Results shown are representative of 3 independent experiments. The graph shows the mean value  $\pm$  SD. Statistics (paired t-test): \*:  $p < 0.05$ .

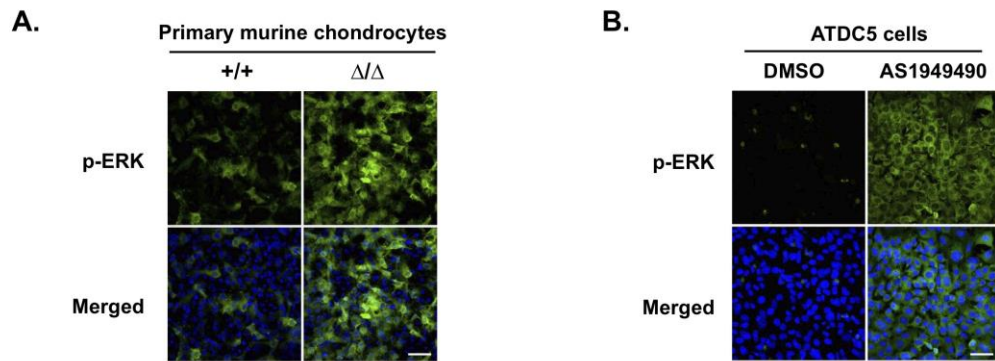
## Supplementary Figure 4



**Supplementary Figure 4: Lentivirus expressing GFP plus an osteocalcin-specific or a scrambled shRNA. A.** ATDC5 cells were transduced with lentivirus expressing GFP plus an osteocalcin-specific (shOCN) or a scrambled shRNA. Twenty four hours after transduction, more than 90% of the cells were GFP positive. Scale bars: 30  $\mu$ m. Results are representative of the 2 osteocalcin-specific shRNA-expressing lentivirus used in the study. **B** and **C.** Western blotting with an osteocalcin antibody on protein extracts isolated from ATDC5 chondrocytes (**B**) and concentrations of carboxylated osteocalcin (GLA-OCN) protein in ATDC5 chondrocyte culture supernatants (**C**). Vinculin served as loading control in the Western blot. A decreased level of the osteocalcin protein is observed in ATDC5 chondrocytes and in ATDC5 chondrocyte culture supernatant when cells are transduced with the osteocalcin-specific shRNA (shOCN)-expressing lentivirus, as compared with the scrambled shRNA-expressing lentivirus. Results are representative of the 2 osteocalcin-specific shRNA-expressing lentivirus used in the study. The graph in **B** shows means (relative to the corresponding vinculin signal and to control = 1)  $\pm$  SD. Statistics (paired t-test): \*\*:  $p < 0.01$ . The graph in **C** shows means  $\pm$  SD of carboxylated osteocalcin (GLA-OCN) in the culture supernatant, related to the time of culture. The area under the curve (AUC) was calculated. Statistics (Student's *t*-test): \*\*\*:  $p < 0.001$ .



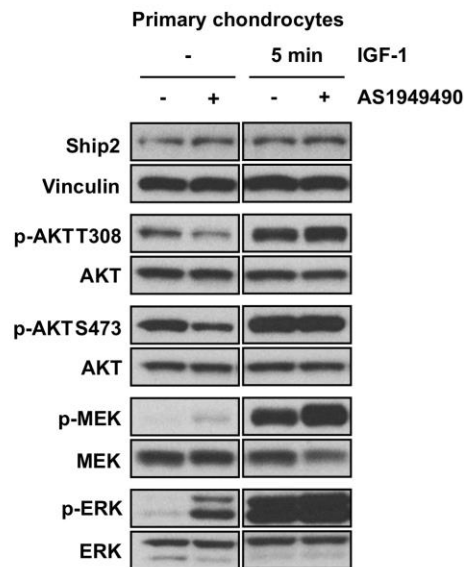
## Supplementary Figure 5



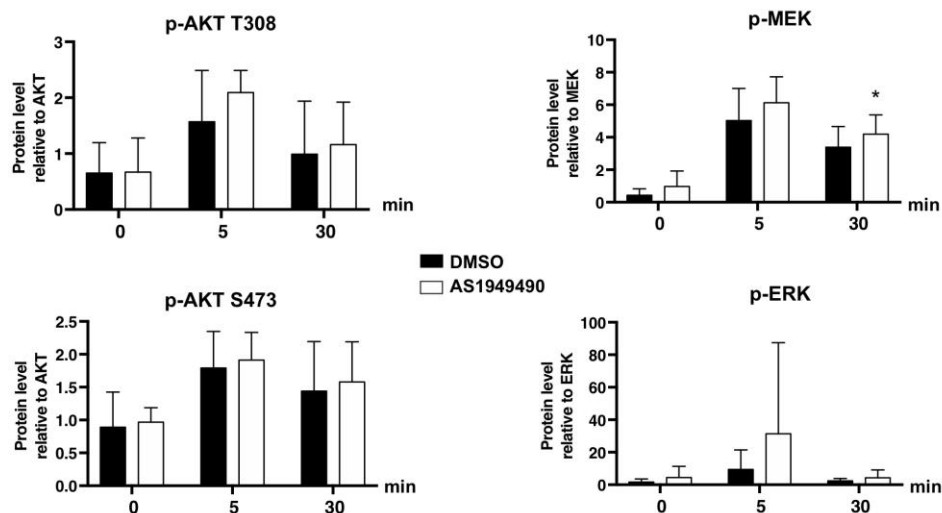
**Supplementary Figure 5: Immunofluorescence analysis of phospho-Erk1/2 in *SHIP2* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  and *SHIP2* inhibitor-treated ATDC5 chondrocytes.** Phosphorylation of Erk1/2 (p-ERK) was analyzed by immunofluorescence in *SHIP2*<sup>+/+</sup> and *SHIP2* <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  chondrocytes (**A**) as well as in 5  $\mu$ M AS1949490 *SHIP2* inhibitor (AS1949490)-treated and DMSO-treated ATDC5 cells (**B**). Cells were incubated with a phospho-Erk1/2 (p-ERK) antibody (green) and DAPI (nuclei, blue). Scale bars: 40  $\mu$ m. Representative images are shown. Results are representative of 3 independent experiments.

## Supplementary Figure 6

A.

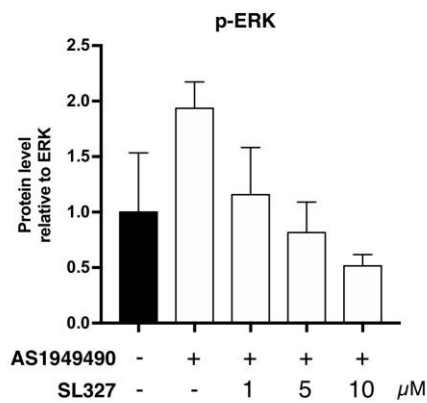


B. FGF2 stimulation



**Supplementary Figure 6: Akt, MEK and Erk1/2 phosphoproteins analysis in SHIP2 inhibitor-treated *SHIP2*<sup>+/+</sup> chondrocytes stimulated with IGF1 or FGF2.** A. Representative Western blotting on extracts isolated from *SHIP2*<sup>+/+</sup> chondrocytes treated (AS1949490) or not (DMSO) with the AS1949490 SHIP2 inhibitor and stimulated or not with 13 nM IGF1 for 5 minutes with antibodies directed against phospho- (p)- and total Akt<sup>T308</sup>, Akt<sup>S473</sup>, MEK and Erk1/2 proteins. Corresponding graphs are presented in Fig 7B. B. *SHIP2*<sup>+/+</sup> chondrocytes were treated (AS1949490) or not (DMSO) with the AS1949490 SHIP2 inhibitor and stimulated or not with 20 nM FGF2 for 5 and 30 minutes. Graphs show mean values of phosphoproteins level relative to total Akt, MEK and Erk1/2 proteins level  $\pm$  SD. Statistics (paired t-test): \*:  $p < 0.05$ .

## Supplementary Figure 7



**Supplementary Figure 7: Determination of the MEK inhibitor concentration that restores in SHIP2 inhibitor-treated chondrocytes a level of Erk1/2 phosphorylation similar to DMSO-treated chondrocytes.** *SHIP2*<sup>+/+</sup> chondrocytes were treated with 10 μM SHIP2 inhibitor (AS1949490 +) or with DMSO (AS1949490 -) in combination with increasing concentrations of the SL327 MEK inhibitor. Phospho-Erk1/2 (p-ERK) level relative to total Erk1/2 level in each condition are presented as mean values ± SD. Results are representative of 2 independent experiments.

**Supplementary Table 1:**

Sequence of primers used for RNA quantification.

Mouse gene	Forward	Reverse
<i>Hdac4</i>	CAGATGGACTTTCTGGCCG	CTTGAGCTGCTGCAGCTTC
<i>Mef2c</i>	ACGAGGATAATGGATGAGCGT	ATCAGTGCAATCTCACAGTCG
<i>Alp</i>	CCAACTCTTTTGTGCCAGAGA	GGCTACATTGGTGTGAGCTTTT
<i>Col2a1</i>	TTGAGACAGCACGACGTGGAG	AGCCAGGTTGCCATCGCCATA
<i>Prg4</i>	TGGAGTGCTGTCCTGATTTCAAGAG	GGTGATTTGGGTGAGCGTTTGTA
<i>Runx2</i>	GACTGTGGTTACCGTCATGGC	ACTTGGTTTTTCATAACAGCGGA
<i>Acan</i>	CCCTCGGGCAGAAGAAAGAT	CGCTTCTGTAGCCTGTGCTTG
<i>Col1a1</i>	GCAACAGTCGCTTCACCTAC	GTGGGAGGGAACCAGATTG
<i>Mmp13</i>	TGTTTGCAGAGCACTACTTGAA	CAGTCACCTCTAAGCCAAAGAAA
<i>Gapdh</i>	AAGCCCATCACCATCTTCCAGGAG	ATGAGCCCTTCCACAATGCCAAAG
<i>VefgA</i>	GCACATAGAGAGAATGAGCTTCC	CTCCGCTCTGAACAAGGCT
<i>Ihh</i>	GACGAGGAGAACACGGGTG	GCGGCCCTCATAGTGTAAGA
<i>Col10a1</i>	GGTGTGAATGGGCGGAAAG	GCTTCCCAATACCTTCTCGTC
<i>Sox9</i>	GAGCCGGATCTGAAGAGGGA	GCTTGACGTGTGGCTTGTTT
<i>Opn</i>	AGCAAGAACTCTTCCAAGCAA	GTGAGATTGTCAGATTCATCCG
<i>Ocn</i>	CCAGCGACTCTGAGTCTGACAA	CCGGAGTCTATTACACCTTACT
<i>Bmp2</i>	TCTTCCGGGAACAGATACAGG	TGGTGTCCAATAGTCTGGTCA
<i>Atf-4</i>	CCTGAACAGCGAAGTGTTG	TGGAGAACCCATGAGGTTTCAA
<i>Enpp1</i>	CTGGTTTTGTCAGTATGTGTGCT	CTCACCGCACCTGAATTTGTT
<i>Tnap</i>	CCAACTCTTTTGTGCCAGAGA	GGCTACATTGGTGTGAGCTTTT
<i>Ank</i>	CAGTCAAGGAGGATGCAGTAGA	CACTGTAGGCTATCAGGGTGT
<i>Osx</i>	TTCTGTCCCCTGCTCCTTCTAG	CGTCAACGACGTTATGCTCTTC
<i>Trap</i>	CACTCCCACCCTGAGATTTGTG	ACGGTTCTGGCGATCTCTTTG
<i>Bsp</i>	TTGAGTTAGCTGCACTCCAAGTG	CGTCGCTTTCCTTCACTTTTG
<i>Ptprv</i>	GCCAGGTGGATTTGACTATGC	GACTCGTTGGTATGAGCTTGG
<i>Mgp</i>	GGCAACCCTGTGCTACGAAT	CCTGGACTCTCTTTTGGGCTTTA
<i>Sparc</i>	GTGGAAATGGGAGAATTTGAGGA	CTCACACACCTTGCCATGTTT
<i>Tgfb2</i>	TCGACATGGATCAGTTTATGCG	CCCTGGTACTGTTGTAGATGGA
<i>Pthrp</i>	CATCAGCTACTGCATGACAAGG	GGTGGTTTTTGGTGTGGGAG
<i>Ship2</i>	ACTCTGCGTCCTGTATCAAAAAG	CAGGGCACAAACAAGACCC

---

# Discussion - Perspectives

---



Parmi les dysplasies humaines figure l'opsismodysplasie, une chondrodysplasie congénitale sévère caractérisée notamment par une micromélie, des anomalies de la face, des os longs raccourcis, une minéralisation épiphysaire retardée et une altération de la plaque de croissance. En 2013, plusieurs groupes de chercheurs émettent l'hypothèse que la 5-phosphatase SHIP2 est un candidat potentiel à l'origine de ce nanisme particulier. Cependant, les mécanismes cellulaires et moléculaires qui conduisent des mutations identifiées dans le gène *INPPL1*, à l'opsismodysplasie sont actuellement totalement inconnus. La variabilité des signes cliniques, radiologiques et histologiques (Below et al., 2013; Cormier-Daire et al., 2003; Huber et al., 2013; Iida et al., 2013b), ajouté au fait que les patients atteints d'opsismodysplasie n'ont pas tous des mutations dans le gène *INPPL1*, suggèrent que cette maladie présente une hétérogénéité génétique (Below et al., 2013; Iida et al., 2013b). Plusieurs modèles animaux (souris et poisson zèbre) ont été créés dans lesquels SHIP2 a été génétiquement partiellement ou totalement inactivé, mais aucun n'a été spécifiquement étudié dans le cadre de la maturation osseuse (Dubois et al., 2012; Jurynek & Grunwald, 2010; Sleeman et al., 2005). Nous avons utilisé une souris SHIP2<sup>Δ/Δ</sup> exprimant une quantité réduite de protéine SHIP2 tronquée et catalytiquement inactive afin d'analyser le développement de la plaque de croissance et la fonction de SHIP2 dans des chondrocytes *in vitro*.

### La souris Ship2<sup>Δ/Δ</sup>, un modèle pour l'étude de l'OPS ?

#### - Aspect macroscopique et différences phénotypiques

En commençant ce travail, l'une de nos premières approches a été de comparer les caractéristiques des souris SHIP2<sup>Δ/Δ</sup> générées par Dubois, avec celles associées à l'OPS. Il y a clairement des similitudes entre les deux modèles, comme le retard de croissance, les anomalies faciales et des anomalies histologiques. Il existe cependant des caractéristiques divergentes entre les deux modèles qui sont peut-être la conséquence d'une variation inter-espèce, de la rareté et la variabilité des observations histologiques répertoriées chez l'homme, et/ou de la nature précise des mutations affectant l'OPS.

A la différence de la maladie humaine, les souris SHIP2<sup>Δ/Δ</sup> ne semblent pas présenter de phénotype à la naissance. En effet du point de vue macroscopique, le retard de croissance et la dysmorphie faciale des souris SHIP2<sup>Δ/Δ</sup> commencent distinctement à apparaître à partir de la fin de la 2<sup>ème</sup> semaine de vie. Cette disparité pourrait être expliquée par la chronologie du développement. Par exemple, les centres secondaires d'ossification se forment à partir de la fin de la 1<sup>ère</sup> semaine post-natale chez la souris, alors que chez l'homme l'ossification est plus précoce car ils apparaissent avant la naissance aux alentours de la 35<sup>ème</sup> semaine de grossesse (revu dans (Kobayashi et al., 2005; Kronenberg, 2003; Peterson, 2007)). En commençant plus tôt, le développement osseux serait proportionnellement plus avancé à la naissance chez l'homme que chez la souris, ce qui favoriserait peut-être l'apparition du phénotype. En vue de cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser des coupes histologiques d'embryons de souris SHIP2<sup>Δ/Δ</sup> et de

les comparer aux embryons contrôles afin d'y détecter d'éventuelles anomalies microscopiques. A noter, qu'au cours de nos expériences de culture de métatarsiens issus de souris SHIP2<sup>Δ/Δ</sup>, nous avons constaté un retard de croissance significatif déjà au 2<sup>ème</sup> jour de culture, ce qui correspondrait au jour 4 de vie post-natale. En revanche, même une fois la croissance terminée, le phénotype murin SHIP2<sup>Δ/Δ</sup> ne semble jamais égaler la sévérité du phénotype décrit chez l'OPS.

Nous n'avons pas identifié de métaphyses évasées dans le modèle murin comme ce qui a été décrit dans l'OPS. L'origine de ce phénomène est inconnue dans le cadre de l'OPS mais il pourrait provenir d'un déficit de minéralisation. En effet, il a été montré dans le cadre du rachitisme que l'échec de minéralisation induit une désorganisation des chondrocytes, et l'hypophosphatémie associée retarde l'apoptose des chondrocytes hypertrophiques. Cela se traduit par des colonnes de cartilage excessivement longues et une accumulation de tissu ostéoïde non-minéralisé sur les côtés de la plaque de croissance (Calder, 2015; Chang et al., 2016; Sabbagh et al., 2005; Tiosano & Hochberg, 2009).

Dans l'OPS, on observe parfois une mortalité post-natale qui a été mise en lien avec un thorax étroit car celui-ci favoriserait l'apparition de complications respiratoires (Beemer & Kozlowski, 1994; Below et al., 2013; Cormier-Daire et al., 2003; Huber et al., 2013; Iida et al., 2013a; Tyler et al., 1999). Comme l'a mentionné Dubois, les souris SHIP2<sup>Δ/Δ</sup> suivent les lois de Mendel ce qui semble écarter une mortalité embryonnaire, et leur mortinatalité ne semble pas plus élevée que celle des souris contrôles (Dubois et al., 2012). Nous n'avons pas investigué plus en profondeur ce paramètre mais selon la littérature, certaines mutations génétiques sont capables d'induire chez la souris un thorax étroit favorisant une mortalité postnatale. Cela signifie probablement que si le phénotype murin était de la même intensité que l'OPS, nous aurions probablement constaté ce genre d'anomalies (Karaplis et al., 1994; Segev et al., 2000; Vega et al., 2004).

Un point que nous avons peu abordé durant notre travail est la dysmorphie faciale présente à la fois chez les individus OPS et les souris SHIP2<sup>Δ/Δ</sup>. La formation du crâne est élaborée selon un mécanisme complexe faisant intervenir des cellules de la crête neurale à l'origine des structures principales dont le neurocrâne (os frontal, pariétal, occipital, sphénoïde et temporal) et le viscérocrâne (mandibule, os maxillaire, zygomatique, et nasal) (Nakamura et al., 2009). Il semblerait que l'existence d'une signalisation anormale (MAPK) au sein des cellules de la crête neurale peut aboutir au développement d'anomalies craniofaciales à la suite de troubles de différenciation cellulaire. En effet, l'expression d'une forme mutée active de ERK1/2 dans ces cellules neurales induit un phénotype craniofacial caractérisé par un raccourcissement du crâne, un hyperthélorisme, une macrocéphalie, une mandibule plus courte. Ces anomalies sont par ailleurs partiellement restaurées par l'administration d'inhibiteurs de ERK1/2 durant la gestation (Nakamura et al., 2009). Les RASopathies sont également décrites chez l'homme et la souris comme responsables d'anomalies craniofaciales. Elles sont toutes caractérisées par



des formes mutées de gènes encodant des composants du complexe RAS de la voie MAPK (BRAF, SOS1/2, RAS, SHP2...) (Cao et al., 2017). Des mutations activatrices de RAF1, SOS1, KRAS responsables d'une suractivation de la voie MAPK induisent chez la souris un retard de croissance, une dysmorphie faciale caractérisée par une dépression de l'os frontal, une macrocéphalie et une hyperthélorisme (Chen et al., 2010; Hernández-Porras et al., 2014; Wu et al., 2011).

Bien que le phénotype craniofacial lié à ces mutations ne reflète pas toujours parfaitement celui des souris SHIP2<sup>Δ/Δ</sup>, cela montre que cette voie joue un rôle primordial pour la conformation du crâne. Il semble par conséquent envisageable d'imaginer que la dysmorphie faciale des souris SHIP2<sup>Δ/Δ</sup>, et peut-être aussi celle des patients OPS, proviendrait d'une suractivation de la voie MAPK.

#### - *Altérations microscopiques de la plaque de croissance*

Afin de compléter l'étude réalisée par Dubois, nous avons analysé des souris SHIP2<sup>Δ/Δ</sup> âgées de 3 semaines, au moment où le phénotype apparaît. A cet âge, les fémurs et tibias sont déjà significativement plus courts d'environ 20-25%. Au sein de la plaque de croissance, nous avons observé une réduction de 25% de la taille de la zone hypertrophique par rapport à la taille de celle des os contrôles, mais aucune différence au niveau de la zone proliférative.

Connaissant l'implication de SHIP2 en amont de voies de signalisation très ubiquitaires comme la voie PI3K/AKT dans d'autres types cellulaires, il est étonnant de constater que la zone proliférative ne soit pas plus affectée alors que très active métaboliquement. Dans le cadre de l'OPS, les chondrocytes prolifératifs présentent principalement une altération d'organisation (absence d'arrangement en colonne), alors que nous n'avons pas relevé de différence entre les souris SHIP2<sup>Δ/Δ</sup> et SHIP2<sup>+/+</sup>. Si l'on part de l'hypothèse que le modèle murin est moins sévère que l'OPS, le défaut organisationnel des chondrocytes prolifératifs est peut-être beaucoup plus subtil, voir absent chez la souris.

Bien qu'aucune analyse quantitative n'ait été encore effectuée, les quelques images histologiques publiées issues de fémurs de patients OPS nous indiquent que la zone hypertrophique est très sévèrement atteinte, avec une réduction presque totale de sa taille (Huber et al., 2013). Cette région constituée de chondrocytes (pré)hypertrophiques est la zone responsable de la majorité de l'allongement en longueur des os longs, il est donc quelque part attendu d'y constater des anomalies. Nous avons mis en évidence une réduction d'environ 65% de la taille de la portion minéralisée de la zone hypertrophique des métatarsiens des souris SHIP2<sup>Δ/Δ</sup> par rapport aux os des souris SHIP2<sup>+/+</sup>. Les mécanismes exacts régulant la minéralisation de la MEC ne sont pas encore totalement compris, mais ils feraient intervenir des vésicules matricielles produites par les chondrocytes hypertrophiques qui viendraient s'insérer entre les composés du cartilage. Celles-ci deviendraient des sites de précipitations d'ions calcium/phosphate à l'origine des cristaux d'hydroxyapatite (Hasegawa et al., 2017; Kirsch et al., 1997).

### - Une zone hypertrophique à deux vitesses ?

Une étude de la plaque de croissance par immunomarquage permettrait certainement d'identifier de nouveaux éléments du mécanisme. Il serait par exemple intéressant d'identifier les marqueurs exprimés dans les différentes zones, comme la zone préhypertrophique afin de savoir si cette zone est par exemple plus affectée que la zone hypertrophique. Il se pourrait que les chondrocytes prolifératifs soient freinés dans leur différenciation en chondrocytes pré-hypertrophiques et/ou qu'une fois entrés en phase hypertrophique ceux-ci terminent prématurément leur différenciation. En revanche selon la littérature, il semble peu probable que la zone hypertrophique soit réduite à la suite d'une résorption accélérée du cartilage calcifié par l'action des ostéoclastes (Touaitahuata et al., 2014).

Des éléments de réponse se trouvent peut-être dans notre analyse transcriptionnelle. Nous n'avons pas identifié de modification dans l'expression d'ARNm codant pour des facteurs (MMP13, COL10a1, VEGFA, TNAP, RUNX2) caractérisant les chondrocytes hypertrophiques. En revanche, nous avons remarqué que l'ARNm codant pour les facteurs IHH et PTHrP est diminué dans des chondrocytes primaires SHIP2<sup>Δ/Δ</sup> cultivés *in vitro*. Ces facteurs participent dans une boucle de feedback qui va réguler la plaque de croissance et le développement des os longs. PTHrP est exprimé par des chondrocytes périarticulaires et diffuse dans la plaque de croissance. Sa synthèse est contrôlée par IHH qui lui est exprimé par les chondrocytes pré-hypertrophiques et ostéoblastes (Murakami & Noda, 2000; Yang et al., 2015). Les chondrocytes prolifératifs sont imprégnés de PTHrP ce qui stimule leur prolifération mais inhibe leur différenciation. En se divisant ceux-ci s'éloignent de la source de PTHrP ce qui lève le blocage de différenciation car PTHrP régule négativement l'hypertrophie des chondrocytes. En déphosphorylant l'histone déacétylase 4 (HDAC4), PTHrP permet à HDAC4 de migrer dans le noyau et réprimer le facteur amplificateur spécifique des myocytes 2C (MEF2C). Ce dernier est un facteur favorisant l'hypertrophie et la différenciation des chondrocytes, mais aussi la différenciation des ostéoblastes (Z. Chen et al., 2020). Les chondrocytes prolifératifs commencent à exprimer IHH ce qui leur permet de se différencier en chondrocytes pré-hypertrophiques. IHH bloque par contre le stade final de leur différenciation hypertrophique (Yang et al., 2015). Etant donné qu'IHH contrôle la synthèse de PTHrP, en l'absence d'IHH on observe une diminution de PTHrP. La déplétion postnatale totale en facteur IHH chez la souris induit une série d'anomalies qui pour certaines sont également présentes chez les souris SHIP2<sup>Δ/Δ</sup> : un retard de croissance, des anomalies de la plaque de croissance (perte d'organisation en colonne des chondrocytes, apparition de chondrocytes hypertrophiques ectopiques, fermeture prématurée de la plaque de croissance, invasion vasculaire prématurée) et une diminution de l'os trabéculaire (Maeda et al., 2007). Tout comme certains patients OPS, les souris PTHrP-KO et HDAC4-KO meurent rapidement à la naissance à la suite de complications respiratoires favorisées par un thorax étroit. Bien qu'à la finalité similaire, ce processus est cependant associé chez les souris PTHrP-KO à une augmentation de l'hypertrophie des chondrocytes et à une minéralisation prématurée des côtes notamment en lien avec une augmentation de l'expression de IHH (Karaplis et al., 1994; Vega et al., 2004). Par conséquent, des taux réduits de PTHrP et IHH traduisent une situation où la zone

préhypertrophique serait inhibée et où les chondrocytes présenteraient une accélération de leur phase hypertrophique. La diminution en facteur PTHrP pourrait provenir d'une réduction d'expression en facteur IHH, et vu que la voie MAPK semble réguler négativement la synthèse d'IHH, on pourrait imaginer que la suractivation de ERK observée dans notre modèle soit l'origine de ces anomalies (Minina et al., 2002; Zhou et al., 2016).

Nous avons également constaté une diminution de l'ARNm codant pour SOX9, un facteur qui stimule la prolifération des chondrocytes et qui est nécessaire pour le passage au stade hypertrophique. Une fois à ce stade de différenciation, il exerce un rôle inhibiteur sur les chondrocytes hypertrophiques ce qui inhibe la minéralisation du cartilage (Amano et al., 2009; Lefebvre & Dvir-Ginzberg, 2017). Chez la souris SOX9<sup>-/-</sup>, on observe d'ailleurs une diminution de la taille de la zone hypertrophique provoquée par un arrêt de la maturation des chondrocytes par absence de différenciation hypertrophique, et se terminant par une apoptose cellulaire prématurée (Hargus et al., 2008). SOX9 régule également l'expression de l'aggrécane (ACAN), un facteur pour lequel son transcrit est également diminué dans nos expériences (Cheng et al., 2009; Ikegami et al., 2011). SOX9 nécessite des signaux FGF et BMP pour être initié et maintenir son expression (Lefebvre & Dvir-Ginzberg, 2017). Etant donné que les voies MAPK/ERK et PI3K/AKT régulent positivement SOX9 (Murakami et al., 2000), nous n'expliquons pas sa diminution. SOX9 est également réprimé par la voie des WNT cependant des études réalisées dans d'autres modèles ont suggéré que SHIP2 aurait peu d'effet sur la voie des WNT, voir un effet activateur (Jurynek & Grunwald, 2010; Zhou et al., 2019).

#### - *SHIP2 régule l'ossification endochondrale*

Les résultats histologiques et l'imagerie par micro-CT des os des souris SHIP2<sup>ΔΔ</sup> nous indiquent que l'ossification endochondrale est principalement affectée par l'expression de la protéine SHIP2 mutée, à l'opposé de l'ossification intramembraneuse. En effet, ce processus responsable de la formation des os longs par l'intermédiaire d'une maquette cartilagineuse nécessite l'intervention des chondrocytes. Il aboutit à la formation de la zone spongieuse primaire composée de spicules de cartilage calcifié entouré de vaisseaux sanguins, de chondrocytes en fin de maturation et de précurseurs ostéogéniques à l'origine de l'os trabéculaire (Aghajanian & Mohan, 2018). Les analyses par micro-CT des fémurs issus de souris SHIP2<sup>ΔΔ</sup> ont permis d'identifier une réduction de la taille de la zone spongieuse primaire, du nombre de travées osseuses et de leur d'interconnexion. Le fait que les travées osseuses soient touchées aussi bien chez la souris SHIP2<sup>ΔΔ</sup> que chez les patients OPS signifie probablement que les ostéoclastes, ostéoblastes et ostéocytes sont également impliqués dans le phénotype. Etant donné que la moitié des chondrocytes hypertrophiques deviennent des ostéoblastes par transdifférenciation, on pourrait imaginer qu'il y ait une modification du nombre d'ostéoblastes découlant de chondrocytes (Aghajanian & Mohan, 2018; Zhou et al., 2014). Via leurs actions anaboliques et cataboliques, les cellules ostéogéniques vont déposer de l'ostéoïde à la place du cartilage calcifié et ils vont modeler l'os cortical et trabéculaire afin de lui conférer sa forme définitive (Sims & Vrahnas, 2014). Nous ne pouvons pas dire que l'os cortical

est sain car nous n'avons pas analysé sa formation et sa composition ni étudié sa résistance mécanique, mais le fait qu'aucune différence significative n'ait été identifiée dans l'épaisseur de l'os cortical (formé par ossification intramembraneuse) signifie probablement que le phénotype de retard de croissance provient plus d'une altération de l'ossification endochondrale, que de l'ossification intramembraneuse. Une étude longitudinale permettrait de compléter nos résultats en analysant des individus d'âges plus variés car nos résultats portent uniquement sur des souris SHIP2<sup>Δ/Δ</sup> âgées de 2-3 jours, 3 semaines et 20 semaines. Une vision longitudinale permettrait de voir l'évolution histologique de la taille de la plaque de croissance, du développement des épiphyses et de l'os trabéculaire. Cela permettrait par exemple de savoir si les plaques de croissance des souris SHIP2<sup>Δ/Δ</sup> fusionnent prématurément étant donné leur taille totale réduite par rapport à celles des souris SHIP2<sup>+/+</sup>. Il serait également intéressant d'étudier l'effet de la délétion de l'activité phosphatase de SHIP2 sur d'autres types cellulaires intervenant dans l'ossification, comme les ostéoblastes, ostéoclastes et les cellules endothéliales qui jouent des rôles très importants avec les chondrocytes.

### Variabilité dans les phénotypes humains et murins

La forte variabilité entre patients opsismodysplasiques et les différences observées après l'inactivation de SHIP2 dans le modèle murin pourraient être aussi expliquées par la diversité des mutations et leurs effets sur la persistance ou non d'une forme tronquée/mutée de la protéine SHIP2, ainsi que les éventuelles modifications d'interactions avec d'autres partenaires protéiques.

En effet, chez la souris SHIP2<sup>Δ/Δ</sup>, seuls les exons 18 et 19 du gène *Inpp1l* sont supprimés. La protéine tronquée résultante est raccourcie de 57 acides aminés par rapport à la protéine SHIP2 sauvage qui en comporte 1257, et possède un niveau d'expression réduit. L'élimination de cette région de 57 acides aminés entraîne très certainement l'inactivation catalytique de l'enzyme, comme prédit par la littérature et mesuré par le test de libération de phosphate en utilisant le PI(3,4,5)P<sub>3</sub> comme substrat (Dubois et al., 2012). Cependant, les effets de la troncature de 57 acides aminés sur les capacités d'interaction de la protéine SHIP2 avec d'autres partenaires n'ont pas été investigués, ce qui ne permet pas de savoir si les fonctions d'interaction sont impliquées dans le mécanisme moléculaire conduisant à l'opsismodysplasie. Il faut cependant noter que l'absence totale de protéine SHIP2 chez la souris knock-out de Sleeman ne semble pas générer une dysmorphie faciale ni de phénotype dysplasique plus sévère que ceux de notre souris SHIP2<sup>Δ/Δ</sup> (Sleeman et al., 2005). Dans la maladie humaine, la plupart des mutations répertoriées sont responsables de l'apparition d'un codon stop, et sont prédites pour générer un allèle non fonctionnel à la suite de la dégradation de l'ARNm non fonctionnel ou sans activité catalytique (Below et al., 2013; Fradet & Fitzgerald, 2017; Huber et al., 2013; Iida et al., 2013b). Des mutations faux-sens du gène *INPPL1* ont également été décrites chez l'homme. Elles sont localisées dans le domaine catalytique et conduisent également à l'inactivation de la fonction 5-phosphatase de la protéine SHIP2 (Below et al., 2013; Fradet & Fitzgerald, 2017; Huber et al., 2013; Iida et al., 2013b).

On pourrait également expliquer ces différences par une modification du ratio de l'implication des différentes phosphatases et kinases qui contrôlent le niveau des phosphoinositides des types cellulaires particuliers, comme les chondrocytes dans notre cas. Comme introduit précédemment, SHIP2 n'est pas la seule 5-phosphatase à avoir une affinité pour le  $PI(3,4,5)P_3$  et le  $PI(4,5)P_2$ , et il existe également d'autres phosphatases comme PTEN qui interviennent également dans la régulation des PI. L'inactivation d'une seule phosphatase ou kinase dans différentes espèces peut légèrement modifier le ratio entre les différents phosphoinositides avec comme conséquence de fortes différences dans l'expression de la sévérité du phénotype. La phosphatase OCRL1 est une illustration de ce phénomène : les mutations inactivatrices de la 5-phosphatase OCRL1 se traduisent par le développement d'un syndrome de Lowe chez l'homme, mais pas chez la souris qui ne présente pas de phénotype majeur suite à cette inactivation (Jänne et al., 1998). Comme l'expression du mutant SHIP2  $\Delta$  est diminuée (+-65%) chez les souris mutées SHIP2 $\Delta/\Delta$ , il serait intéressant de s'assurer que ni l'expression, ni l'activité des autres membres de la famille des 5-phosphatases et de la 3-phosphatase PTEN ne soient modulées dans notre modèle. Ceci nous permettrait d'exclure une compensation par l'un d'entre eux.

### Alternatives au modèle murin SHIP2 $\Delta/\Delta$

Afin de discriminer l'impact des fonctions catalytiques et non-catalytiques de SHIP2, il serait intéressant de générer un modèle murin SHIP2 $\Delta/\Delta$  exprimant une protéine catalytiquement inactive mais ne présentant pas de réduction d'expression protéique, afin de le confronter avec le modèle de souris SHIP2 $^{-/-}$  générées par Sleeman. Bien que le phénotype dysplasique des souris SHIP2 $^{-/-}$  générées par Sleeman ne semble pas plus sévère que celui présenté par les souris SHIP2 $\Delta/\Delta$ , il semble en revanche y avoir une différence entre les souris hétérozygotes (Sleeman et al., 2005). En effet, alors que Dubois n'a pas identifié de différence entre la croissance des souris SHIP2 $^{+/+}$  et SHIP2 $^{+/\Delta}$ , Sleeman a rapporté un retard de croissance significatif entre les souris SHIP2 $^{+/+}$  et les souris SHIP2 $^{+/-}$  (Dubois et al., 2012; Sleeman et al., 2005). En se basant sur le fait que l'allèle  $\Delta$  permet tout de même l'expression d'un tiers de protéine SHIP2, la souris SHIP2 $^{+/-}$  exprimerait par conséquent moins de protéine SHIP2 que les souris SHIP2 $^{+/\Delta}$ . Cette hypothèse pourrait expliquer pourquoi on voit apparaître un retard de croissance seulement chez les souris SHIP2 $^{+/-}$ . Cette réflexion permet également d'appuyer l'hypothèse que le phénotype observé impliquerait également d'autres fonctions non-catalytiques de SHIP2 étant donné que l'activité catalytique 5-phosphatase devrait être théoriquement similaire dans ces deux modèles hétérozygotes.

Pour générer un modèle murin encore plus proche de l'OPS, il pourrait être intéressant d'introduire les mutations rencontrées dans l'OPS. Cette méthodologie est d'ailleurs fréquemment utilisée. Par exemple, il existe des souris exprimant la mutation activatrice (p.Gly374Arg) du récepteur FGFR3 afin de reproduire la mutation activatrice correspondante (p.Gly380Arg) rencontrée dans plus de 95% des patients humains atteints d'achondroplasie humaine (Wang, Spatz, et al., 1999). Cette méthodologie est cependant assez incertaine dans le cadre de l'OPS où, à la différence de l'achondroplasie

par exemple, il n'y a pas une mutation largement prédominante (Tableau 1, page 35). En revanche, il serait intéressant d'introduire des codons stop à différents niveaux du gène de SHIP2 afin de générer des modèles produisant des protéines tronquées de certains de leur domaine. Il serait d'ailleurs particulièrement judicieux de générer un modèle murin produisant une protéine SHIP2 tronquée de l'entièreté de son domaine catalytique car la plupart des mutations répertoriées dans l'OPS sont prédites pour affecter ce domaine ce qui laisse penser que ce domaine présente bien une place prédominante dans la maladie (Tableau 1, page 35). Enfin, il serait également intéressant d'étudier l'impact du domaine C2 de SHIP2 car il semblerait que ce domaine augmente l'activité du domaine 5-phosphatase (Le Coq et al., 2017).

### Les chondrocytes comme modèle cellulaire pour l'étude de SHIP2

La confirmation de l'implication de SHIP2 dans le processus d'ossification endochondrale est un élément important de notre travail. La plaque de croissance est altérée histologiquement et sa minéralisation présente des altérations aussi bien chez la souris que chez l'homme. Ces altérations peuvent être la conséquence de l'inactivation de SHIP2 dans plusieurs types cellulaires intrinsèques et extrinsèques à l'os. Mais les résultats obtenus sur base du modèle de culture de métatarsiens *ex-vivo* permettent de dire que les altérations intrinsèques à l'os suffisent à induire des anomalies caractéristiques de l'ostéodysplasie au niveau de la croissance osseuse, de l'histologie et de la minéralisation. Par conséquent, l'inactivation de SHIP2 dans des cellules situées en dehors de l'os en croissance ne semblent pas avoir un rôle majeur dans la genèse du phénotype chez des souris juvéniles, renforçant l'hypothèse que les cellules osseuses incluant les ostéo-progéniteurs, les ostéoblastes, ostéoclastes et/ou chondrocytes jouent un rôle essentiel dans la pathologie.

Nous avons décidé de nous focaliser sur l'étude de SHIP2 dans les chondrocytes, le type cellulaire central de la plaque de croissance où se concentrent les anomalies et car aucune autre anomalie significative n'a été détectée dans l'épaisseur de l'os cortical, un paramètre fortement dépendant de l'ossification intramembraneuse faisant peu intervenir les chondrocytes (Breeland & Menezes, 2019).

Nous avons tenté d'inactiver spécifiquement l'activité 5-phosphatase de SHIP2 dans les chondrocytes afin de savoir si ce type cellulaire est seul responsable du phénotype dysplasique. En effet, il suffit de parcourir la littérature pour constater que des manipulations génétiques affectant spécifiquement les chondrocytes peuvent suffire à induire d'importantes anomalies du développement (Murakami et al., 2004; Stanton et al., 2004; Zhang et al., 2006). En croisant des souris SHIP2<sup>flox/flox</sup> avec des souris Col2a1 Cre, nous avons obtenu une souris exprimant spécifiquement la protéine tronquée SHIP2  $\Delta$  dans les chondrocytes. De la même manière, nous avons généré une souris SHIP2<sup>flox/flox</sup> Col2a1 Cre<sup>ERT2</sup> inducible nous permettant d'abolir l'activité 5-phosphatase de SHIP2 dans les chondrocytes à l'aide d'hydroxytamoxifène. Malheureusement, nos essais d'inactivation n'ont pas abouti à la suite de taux de recombinaison *in vivo* et *in vitro* trop faibles, se traduisant par la persistance d'une grande quantité de protéine SHIP2 sauvage dans les chondrocytes des souris SHIP2<sup>flox/flox</sup> Col2a1 Cre et SHIP2<sup>flox/flox</sup>

Col2a1 Cre<sup>ERT2</sup>. Nous avons en quelque sorte généré l'équivalent d'une souris hétérozygote ship2<sup>+/-</sup> qui ne présente pas d'anomalie. Par conséquent, nous ne pouvons pas exclure que des altérations dans d'autres types cellulaires peuvent aussi contribuer au phénotype opsismodysplasique.

Durant ce travail, nous avons étudié les fonctions de SHIP2 *in vitro* dans un modèle cellulaire murin. Il serait cependant judicieux de réitérer nos expériences avec des chondrocytes humains. En effet, il est possible que l'espèce soit à l'origine de différences phénotypiques. Nous nous sommes d'ailleurs posé cette question en cours de doctorat. Nous avons traité des chondrocytes articulaires humains avec l'inhibiteur de SHIP2 (AS1949490) et évalué ERK par western blot. Les résultats préliminaires ont montré une augmentation significative de la phosphorylation de ERK dans les cellules traitées avec l'inhibiteur. Bien que ces résultats confirment nos observations précédemment obtenues avec les chondrocytes murins, nous ne sommes pas aller plus loin pour deux raisons. Premièrement car ces cellules ont peut-être une capacité de prolifération et de différenciation différentes que les chondrocytes de la plaque de croissance. Deuxièmement, vu que les cellules que nous nous sommes procurées étaient issues de patients arthrosiques, elles présentaient de base une augmentation de la phosphorylation de ERK par rapport aux cellules saines, ce qui aurait pu interférer avec la suite de nos expériences.

### **Inhibiteur AS1949490 et protéine SHIP2 $\Delta$**

Nous avons confronté des résultats d'expérience faisant intervenir l'inhibiteur AS1949490, avec ceux obtenus depuis des cellules SHIP2 <sup>$\Delta/\Delta$</sup> . Cette molécule inhibitrice reproduit presque l'entièreté des altérations engendrées par l'inactivation génétique de SHIP2. Néanmoins, nous avons obtenu des résultats que nous n'expliquons pas.

L'inhibiteur AS1949490 semble induire plus d'effet que l'inactivation génétique de l'activité 5-phosphatase de SHIP2 dans le modèle de culture de métatarsiens. De plus et de manière inattendue, AS1949490 n'induit pas d'augmentation significative de la phosphorylation d'AKT comme observé dans des chondrocytes SHIP2 <sup>$\Delta/\Delta$</sup>  stimulés avec de l'IGF1, alors que la suractivation de ERK est en revanche présente dans les deux modèles. En effet, en observant les coupes histologiques réalisées sur des métatarsiens de souris sauvages traités avec 10 $\mu$ M d'AS1949490, on constate que la zone hypertrophique est plus de deux fois plus petite que dans les coupes issues de métatarsiens de souris SHIP2 <sup>$\Delta/\Delta$</sup> . Ce résultat se rapproche d'ailleurs de ce qui a été observé chez certains patients OPS. Parmi les hypothèses envisageables, il serait possible qu'en plus d'inactiver l'activité 5-phosphatase de SHIP2, l'inhibiteur interfère avec des interactions protéiques que SHIP2 pourrait avoir avec d'autres partenaires et/ou qu'il interfère avec d'éventuelles modifications post-traductionnelles de l'enzyme. Comme pour les protéines SHIP2 mutantes détectées dans la maladie humaine et chez la souris SHIP2 <sup>$\Delta/\Delta$</sup> , les capacités d'interaction de la protéine SHIP2 incubée avec l'inhibiteur AS1949490 n'ont pas été évaluées. Nous avons par ailleurs observé un effet synergique sur le retard de croissance de métatarsiens de souris

SHIP2<sup>Δ/Δ</sup> lorsque l'on ajoute l'inhibiteur AS1949490. La spectrométrie de masse sur des échantillons incubés ou non avec l'inhibiteur permettrait d'évaluer cette hypothèse. Une autre explication de nos résultats serait liée à une éventuelle toxicité de l'inhibiteur, mais l'évaluation de l'activité métabolique (MTT assay) de chondrocytes traités avec des concentrations croissantes d'AS1949490 (jusqu'à 20 μM) ne semble pas étayer cette hypothèse.

Une autre raison pouvant expliquer les différences histologiques obtenues avec l'inhibiteur serait d'intégrer l'absence de suractivation d'AKT évoquée précédemment. Alors que la voie MAPK/ERK semble réguler négativement l'hypertrophie des chondrocytes, la voie PI3K/AKT l'influencerait positivement. En effet, l'utilisation d'inhibiteur pharmacologique de PI3K (LY294002) sur des tibias embryonnaires de souris induit un retard de croissance, dont une réduction de la taille de la zone hypertrophique (Ulici et al., 2008). Il se pourrait que la combinaison d'un niveau d'activation normal d'AKT combiné à la suractivation de la voie MAPK/ERK contribuerait davantage à réduire la taille de la zone hypertrophique et par conséquent la croissance.

### **L'ostéocalcine serait impliquée dans le retard de minéralisation**

Un autre résultat important et inattendu de nos recherches a été de montrer que l'ostéocalcine (OCN) joue un rôle dans le défaut de minéralisation observé *in vitro* dans les chondrocytes lorsque SHIP2 est inactivé, et probablement aussi dans la souris opsismodysplasique. En effet, l'expression de l'OCN est significativement augmentée dans les différents modèles de culture de chondrocytes testés où SHIP2 est inactivé, et où la production de nodules de minéralisation est systématiquement diminuée. En ciblant l'ARNm de l'OCN dans des chondrocytes en culture avec un shRNA spécifique, nous avons induit une augmentation significative de la formation de nodules de minéralisation.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus chez les souris déficientes pour l'OCN, où les deux gènes codant pour l'OCN dans les os sont délétés (Ducy et al., 1996). Chez ces souris OCN KO, l'absence d'OCN est associée à une augmentation de la croissance osseuse, de la masse osseuse, et la formation de larges cristaux d'hydroxyapatite, c'est-à-dire le phénotype opposé à celui observé dans les cultures de chondrocytes déplétées en SHIP2. Étonnamment, la surexpression de l'OCN dans des ostéoblastes de souris transgéniques α1(I)Col-Osteocalcine n'a pas d'effet sur la minéralisation osseuse (Murshed et al., 2004), ce qui suggère que le phénotype de défaut de minéralisation observé en l'absence de SHIP2 serait peut-être dû à un effet chondrocyte-spécifique et non pas ostéoblaste-spécifique. Sachant que l'ostéopontine (OPN) et l'OCN sont tous deux des inhibiteurs de minéralisation osseuse (Bailey et al., 2017), le fait que les concentrations d'ARNm et de protéines d'OPN soient aussi augmentées dans les cultures de chondrocytes où SHIP2 est inactivé renforce l'hypothèse que l'absence de SHIP2 induit un défaut de minéralisation.

L'OCN ne semble pas agir seule pour contrôler la minéralisation. Par exemple, elle est capable de s'associer à l'OPN et d'autres études ont montré que la présence concomitante d'OCN et de fétuine (α2HS-glycoprotéine) inhibe *in vitro* la formation et la morphologie de cristaux sphéroïdes



(calcospherite) durant le processus de calcification (Libouban et al., 2009; Nikel et al., 2013, 2018). Par conséquent, une étude approfondie de l'expression des protéines « environnantes » à l'OCN pourrait permettre de mieux comprendre le mécanisme de retard de minéralisation observé dans nos modèles.

La synthèse de l'OCN est induite par la voie MAPK/ERK via RUNX2 à la suite d'administration de FGF2 à des ostéoblastes (Xiao et al., 2002), et à l'administration de leptine à des cellules ATDC5 (Han et al., 2016). Les voies p38 MAPK et PI3K/AKT influencent également positivement l'expression d'OCN dans des ostéoblastes et des myoblastes (Hu et al., 2003; Liu et al., 2017). Il est donc tout à fait possible que ces résultats soient la conséquence de la suractivation de ERK que nous avons observé. Les chondrocytes n'étant pas les seules cellules à synthétiser de l'OCN, il faudrait aussi étudier son expression dans les ostéoblastes pour d'avantage affiner nos hypothèses.

L'OCN est présente dans l'os sous une forme inactive (GLA-OCN) ayant une grande affinité pour les cristaux d'hydroxyapatite et le  $\text{Ca}^{2+}$ , et à l'inverse sous une forme active (GLU-OCN) circulante dans le sang (Rossi et al., 2019). Interpelé par nos résultats, nous avons décidé d'évaluer par ELISA la concentration sanguine en OCN dans les souris SHIP2 $\Delta\Delta$ . Nous avons identifié que les deux formes (GLU-OCN, GLA-OCN) sont présentes en concentration significativement réduite dans le serum des souris SHIP2 $\Delta\Delta$  âgées de 3 semaines, comparées aux souris SHIP2 $^{+/+}$  (résultats non publiés). Vu que la production sérique de GLU-OCN nécessite l'activité des ostéoblastes, nous pourrions émettre l'hypothèse que les souris SHIP2 $\Delta\Delta$  présentent une réduction de la résorption osseuse (Rossi et al., 2019). Ce paramètre est d'ailleurs utilisé en médecine humaine pour évaluer le remodelage osseux, par exemple dans le cadre de l'ostéoporose (Liu et al., 2019). Le rôle du GLA-OCN sérique n'est pas encore connu, mais cette tendance inverse (serum/os) a déjà été identifiée dans un modèle murin d'ostéogenèse imparfaite exprimant une forme mutée dominante de COL1A1. Dans ce cadre, l'auteur a identifié des taux élevés d'OCN sériques avec une expression transcriptionnelle osseuse basse (Boraschi-Diaz et al., 2017). Il semble par ailleurs y avoir un lien entre COL1A1 et l'OCN (Boraschi-Diaz et al., 2017; Chen, Guo, et al., 2014; Kalajzic et al., 2002).

Si l'implication de l'OCN dans le modèle SHIP2 $\Delta\Delta$  se confirme *in vivo*, il pourrait être intéressant de croiser à l'avenir les souris SHIP2 $\Delta\Delta$  avec des souris OCN $^{-/-}$  dans le but d'obtenir une souris SHIP2 $\Delta\Delta$  OCN $^{-/-}$ . Celle-ci produirait un taux réduit d'OCN par rapport aux souris SHIP2 $\Delta\Delta$  ce qui, selon notre hypothèse, pourrait permettre de restaurer le retard de minéralisation.

### **La voie MAPK/ERK, principal acteur du phénotype des souris SHIP2 $\Delta\Delta$ ?**

A la vue des différentes anomalies répertoriées, il semblerait que la voie MAPK/ERK joue un rôle majeur dans le phénotype dysplasique des souris et probablement des patients OPS. Les niveaux de phospho-MEK et phospho-ERK1/2 sont significativement augmentés dans les chondrocytes inactivés génétiquement et pharmacologiquement pour SHIP2 en réponse à la stimulation au sérum ou à l'IGF-1.

De plus, le traitement de ces cellules ou des os entiers avec un inhibiteur de phospho-MEK rétablit partiellement la production de nodules de minéralisation, la taille de la zone hypertrophique et la croissance osseuse.

L'activation constitutive des voies MAPK dans les chondrocytes est un élément décrit dans la littérature comme conduisant parfois à un phénotype très semblable à celui des souris SHIP2<sup>Δ/Δ</sup>. Le phénotype qui se rapproche le plus de notre modèle murin est représenté par les souris transgéniques qui expriment de manière constitutive une forme mutée active de MEK1 spécifiquement dans les chondrocytes. Celles-ci présentent une augmentation de la phosphorylation de ERK1/2 dans leurs chondrocytes, un raccourcissement du squelette axial et appendiculaire, un dysmorphisme facial avec un arrondissement du crâne, une réduction de la zone hypertrophique et un retard de la minéralisation osseuse (Murakami et al., 2004). La suractivation de MKK6 dans les chondrocytes induit, *via* la kinase p38, un nanisme caractérisé par une prolifération réduite des chondrocytes, une réduction de la taille de la zone hypertrophique, un retard de la formation des centres d'ossification, une diminution de l'expression de IHH, PTHrP (Zhang et al., 2006). En revanche, ces souris ne présentent pas le dysmorphisme facial des souris de Murakami ni des souris SHIP2<sup>Δ/Δ</sup>, suggérant que le phénotype que nous observons ferait intervenir la voie MAPK/ERK et non pas la voie p38 MAPK. A l'inverse la délétion de ERK1/2 dans plusieurs types cellulaires dont les chondrocytes hypertrophiques conduit une expansion de la zone hypertrophique. Étonnamment, ces souris présentent tout de même vers l'âge de 3 semaines un retard de croissance et des os longs plus courts (Chen et al., 2015). Ces derniers résultats sont cependant à pondérer car pour inactiver ERK1/2 les auteurs ont utilisé le promoteur de l'OSTERIX, un facteur de transcription en aval de RUNX2. En plus de n'être exprimé qu'à partir des chondrocytes hypertrophiques, ce promoteur est également exprimé par d'autres types cellulaires comme les cellules de lignées ostéoblastiques, des cellules stromales, des adipocytes, des cellules de l'épithélium intestinal (Chen, Shi, et al., 2014; Oh et al., 2012).

Les voies de signalisation FGF font intervenir la cascade des MAPK. Des mutations activatrices du récepteur FGFR3 induisent également un nanisme et des altérations relativement similaires au phénotype des souris SHIP2<sup>Δ/Δ</sup> (Su et al., 2008, 2010). Il nous a paru étonnant de ne pas observer d'augmentation significative de la phosphorylation de MEK-ERK1/2 dans les chondrocytes inactivés pour SHIP2 lorsqu'ils sont stimulés avec du FGF2. Nous avons choisi ce facteur de croissance car il est synthétisé par les chondrocytes et qu'il est reconnu par le récepteur FGFR3 (également par les récepteurs FGFR1 et FGFR2). Ces trois récepteurs sont exprimés de manière différente par les chondrocytes. Par exemple les chondrocytes prolifératifs et pré-hypertrophiques expriment fortement FGFR3, alors que les chondrocytes hypertrophiques expriment fortement FGFR1 et peu FGFR3. Ils sont également capables de reconnaître d'autres ligands, comme *Fibroblast growth factor 9 and 18* (FGF9 et FGF18) qui eux sont synthétisés par le périchondre et le périoste (Ornitz & Marie, 2015). Il serait intéressant de réitérer ces expériences en stimulant cette fois-ci les cellules avec du FGF9/ FGF18 car ils ont des effets différents par rapport au FGF2. Alors que FGF2 et FGF9 favorisent tous deux la prolifération des

chondrocytes, FGF2 bloque également leur différenciation (préhypertrophique) tandis que FGF9 inhibe leur différenciation terminale. (Hung et al., 2007; Liu et al., 2007; Ornitz & Marie, 2015; Weksler et al., 1999). Récemment, Fafilek a identifié dans un modèle in-vitro de chondrosarcome *Swarm rat chondrosarcoma* (RCS) que SHIP2 exerce une fonction régulatrice dans la voie FGF en modulant la forme du signal d'activation de ERK. Étonnamment, la perte de SHIP2 transforme l'activation soutenue de ERK en un signal transitoire, se traduisant par des effets inverses à ceux que nous avons obtenus. Ces résultats contredisent également l'augmentation de la phosphorylation de ERK et AKT que l'auteur a observée après traitement avec l'inhibiteur AS1949490 (Fafilek et al., 2018).

A l'inverse, la stimulation de ces cellules avec de l'IGF1 reproduit la suractivation de la voie MAPK/ERK observée après stimulation avec du sérum. Le récepteur *Insulin-like growth factor 1 receptor* (IGF1R) activé est connecté à la voie MAPK/ERK via le recrutement du complexe GRB2/SOS. Une fois ce complexe recruté près du récepteur, il va mener à l'activation de RAS chapeautant la voie MAPK/ERK. Le récepteur IGF-1R peut également induire l'activation de la voie PI3K/AKT via le recrutement des protéines IRS qui vont interagir avec la protéine GRB2, et la sous-unité P85 de la PI3K (Y. Wang et al., 2013). La voie IGF1 a été identifiée comme impliquée lors de différentes étapes de la différenciation pendant l'ossification endochondrale, notamment celle des chondrocytes hypertrophiques (Cooper et al., 2013; Mohan & Kesavan, 2012; Wang et al., 2014; Yang et al., 2017). Comme cité précédemment, ce sont les souris de Murakami exprimant une forme active de MEK1 dans les chondrocytes qui représentent le modèle le plus proche du phénotype des souris SHIP2<sup>Δ/Δ</sup> (Murakami et al., 2004). Nous pourrions expliquer cette observation par le fait que le phénotype dysplasique SHIP2<sup>Δ/Δ</sup> serait la résultante des altérations de différentes voies de signalisation en présence de la protéine tronquée. En effet, des mutations affectant SHIP2, MEK1 ou ERK engendreraient une signalisation cellulaire anormale dans plus de voies différentes (EGFR, FGFR, IGFR, PDGFR, ...) que des mutations affectant directement un seul récepteur RTK spécifique (FGFR3 par exemple).

### **Implication de la voie PI3K/AKT ?**

Plusieurs études ont montré que SHIP2 régulait négativement l'activité d'AKT en déphosphorylant le PI(3,4,5)P3 (Erneux et al., 2011; Ikubo et al., 2009; Ramos et al., 2018; Ramos, Ghosh, Dedobbeleer, et al., 2019; Zhang et al., 2007). Cependant, l'impact de SHIP2 sur l'activité d'AKT est intimement lié au type cellulaire : dans les cellules HTC116 issues de cancer colorectal, la phosphorylation d'Akt est réduite quand l'expression de SHIP2 est diminuée, et n'affecte pas la prolifération cellulaire (Hoekstra et al., 2016). Cet effet est également observé dans des cellules de cancer du sein MDA-MB-232 (Prasad, 2009). Lorsque des fibroblastes primaires issus de patients OPS sont stimulés pendant 5 min avec de l'EGF, une diminution de phospho-AKT (S473) est détectée, comparée aux cellules des individus sains (Ghosh et al., 2017). Dans notre modèle de chondrocytes primaires où SHIP2 est inactivé avec AS1949490, la phosphorylation d'AKT sur S473 et T318 n'est pas augmentée après stimulation avec du sérum, de l'IGF1 ou du FGF2, comparés aux cellules contrôles.

Ce résultat est en accord avec la déplétion d'AKT1 chez la souris (et non pas la surexpression/suractivation d'AKT) qui est associée avec un nanisme sévère et un retard d'ossification (Peng et al., 2003; Ulici et al., 2009). De manière assez étonnante, les anomalies histologiques de la plaque de croissance identifiées chez les souris AKT1<sup>-/-</sup> sont relativement semblables à celles que nous avons identifiées chez les souris SHIP2<sup>Δ/Δ</sup> : les souris AKT1<sup>-/-</sup> présentent une diminution de taille de la zone hypertrophique, en particulier au niveau de la portion calcifiée, sans présenter d'anomalie dans les couches supérieures de la plaque de croissance. En revanche, ces souris ne présentent pas de dysmorphie faciale associée au nanisme (Fukai et al., 2010; Peng et al., 2003; Ulici et al., 2009).

Nous ne pouvons pas exclure que la voie PI3K/AKT ne soit pas impliquée dans le phénotype. Elle pourrait par exemple expliquer pourquoi nous observons un phénotype plus sévère en présence d'AS1949490 que de la protéine Δ. Comme expliqué dans l'introduction, la voie PI3K/AKT est capable d'influencer l'activation de la voie MAPK/AKT via un phénomène de cross-talk. Par conséquent, d'autres expériences sont nécessaires pour définir l'implication réelle de la voie PI3K/AKT, en commençant par stimuler des chondrocytes en présence d'inhibiteur de la voie PI3K/AKT et de vérifier si l'activation de ERK est affectée.

### **Investiguer les autres fonctions du PI(3,4,5)P3**

Les fonctions du PI(3,4,5)P3 (en partie régulé par SHIP2) ne se limitent pas seulement à induire l'activation d'AKT. En effet, l'action du PI(3,4,5)P3 permet également d'activer une série de GTPases de la famille Rho, dont RhoA.

Cette famille de GTPases joue des rôles très importants car les protéines qui la composent régulent l'organisation du cytosquelette en contrôlant la (dé)polymérisation de l'actine à travers de multiples voies de signalisation. Selon la littérature, l'adhésion intercellulaire et cellules-MEC est très importante car elle régule la différenciation cellulaire (revu par (Woods et al., 2007). C'est l'une des raisons qui explique pourquoi il est important de cultiver les chondrocytes primaires en culture *in vitro* tri-dimensionnelles, afin de maximiser les contacts intercellulaires et réduire l'apparition d'une dédifférenciation cellulaire trop importante (Woods & Beier, 2006).

La GTPase RhoA est impliquée dans la polarisation cellulaire des chondrocytes. En effet, il a été montré que le complexe RhoA/ROCK inhibe à la fois la chondrogenèse en inhibant le facteur de transcription SOX9, et la différenciation hypertrophique (Woods et al., 2005, 2007; Woods & Beier, 2006). Il a également été montré dans un modèle ATDC5 que la surexpression de RhoA augmente la prolifération, retarde la différenciation cellulaire et réduit la production de composés de la MEC. A l'inverse, sa répression induit une diminution de la prolifération et accélère la différenciation hypertrophique (G. Wang et al., 2004).

Plusieurs travaux ont établi des liens entre SHIP2 et RhoA. Premièrement, SHIP2 régule indirectement l'action de RhoA en modulant l'accumulation de PI(3,4,5)P3 au niveau du front membranaire afin de

maintenir la polarité avant-arrière de la cellule. (Kato et al., 2012). Deuxièmement, dans un modèle de gliome U-251, il a été montré que SHIP2 interagit aussi directement avec GTP-RhoA via son extrémité N-terminale pour réguler la migration et l'étalement cellulaire. La perte de cette interaction par la déplétion totale de SHIP2 atténue par ailleurs la migration et la polarisation cellulaire. Enfin, il a été montré que lorsqu'on augmente l'activité de SHIP2 avec de l'amyloïde oligomérique  $\beta$ , cela augmente l'accumulation du PI(3,4)P2 au niveau des endosomes tardifs et des lysosomes, favorisant la dégradation d'ARAP3 (qui est un régulateur négatif de RhoA) ce qui induit une hyperactivation de RhoA (Lee et al., 2019).

Par conséquent, il serait tout à fait pertinent d'étudier l'interaction RhoA-SHIP2 dans notre modèle et analyser les capacités de migration des chondrocytes, de mesurer les concentrations du PI(3,4,5)P3 et PI(3,4)P2 dans plusieurs conditions (inhibiteur de SHIP2, inhibiteur de MEK...). Les résultats de ces expériences pourraient permettre de progresser dans de nouvelles « directions » afin de mieux comprendre certains éléments du phénotype comme l'absence d'organisation en colonne des chondrocytes de la plaque de croissance des patients OPS.

### **Hypothèses sur le mécanisme de régulation de la voie MAPK/ERK par SHIP2**

Il ressort de notre travail que la plupart des traits phénotypiques apparus à la suite de l'expression du mutant SHIP2  $\Delta$  (ou en présence d'AS1949490) pourraient être expliqués par l'identification du mécanisme par lequel SHIP2 régule la voie MAPK/ERK. Plusieurs études ont suggéré que l'inhibition de SHIP2 pouvait mener à une suractivation de la voie MAPK en réponse aux facteurs de croissance, ou inversement que la surexpression de SHIP2 pouvait réduire l'activité de la voie MAPK (Agollah et al., 2014; Artemenko et al., 2009; Blero et al., 2001; Faflek et al., 2018; Jurynek & Grunwald, 2010; Kagawa et al., 2005; Sasaoka et al., 2003). La stimulation à l'insuline induit en l'absence de SHIP2 une suractivation de la voie PI3K/AKT et de la voie MAPK dans des cellules issues d'ovaire de hamster chinois (Blero et al., 2001). Chez le poisson zèbre, Ship2a (l'homologue le plus probant de SHIP2) est requis pour l'établissement du pattern dorso-ventral et atténue la voie de signalisation du FGF chez l'embryon pré-gastrula car son inhibition induit une augmentation de l'activation de pMAPK (Jurynek & Grunwald, 2010). SHIP2 a également été identifié comme un régulateur négatif de la voie MAPK dans des cellules endothéliales lymphatiques (Agollah et al., 2014) et dans des cellules RCS comme énoncé précédemment (Faflek et al., 2018).

Plusieurs hypothèses ont été proposées qui incluent des mécanismes catalytiques et non-catalytiques de la protéine SHIP2. Des études menées sur des cellules issues d'ovaire de hamster chinois et des cellules de muscle lisse vasculaire suggèrent que via son domaine SH2, SHIP2 pourrait entrer en compétition avec l'association des molécules adaptatrices SHC et GRB2, ce qui réduirait la transmission du signal en aval du récepteur tyrosine kinase activé (Kagawa et al., 2005; Sasaoka et al., 2003). De la même manière, des études fonctionnelles sur SHIP1, ont montré que le domaine 5-phosphatase régule

négalement la voie MAPK via l'inhibition de la liaison du complexe d'échange nucléotide GRB2/SOS avec la protéine adaptatrice SHC, ce qui est un élément nécessaire à l'activation de RAS (Sharma et al., 2005; Tridandapani et al., 1997).

Des études ont également identifié SHIP2 comme un activateur de la voie MAPK. Par exemple, dans des préadipocytes 3T3-L1, l'expression d'un mutant SHIP2 catalytiquement inactif (PDR/AAA) induit une réduction de l'activation de ERK1/2 médiée par le récepteur des facteurs de croissance dérivés des plaquettes (PDGFR) (Artemenko et al., 2009). La perte d'activité phosphatase de SHIP2 dans des cellules RCS et dans le cadre de la voie FGF, transforme une activation soutenue de ERK en un signal transitoire (Fafilek et al., 2018). Le mécanisme sous-jacent ferait appel aux fonctions non-catalytiques de SHIP2 en recrutant les kinases de la famille SRC afin de promouvoir la phosphorylation des récepteurs FGFR et d'assembler le complexe protéique permettant de transmettre le signal vers ERK. Dans ce modèle, SHIP2 est également capable d'interagir directement avec les récepteurs FGFR, d'être phosphorylée par les récepteurs FGFR activés, de phosphoryler les protéines adaptatrices *Fibroblast growth factor receptor substrate 2* (FRS2) et de recruter la tyrosine phosphatase *Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11* (PTPN11) (Fafilek et al., 2018).

SHIP2 pourrait également réguler la voie MAPK par une interaction directe avec un effecteur de la cascade de signalisation, comme SHIP1 régule la protéine tyrosine kinase TEC. Celle-ci joue un rôle essentiel dans l'activation de la *phospholipase Cγ* (PLCγ) en aval du TCR dans les lymphocytes T. En l'absence d'activation, TEC est déphosphorylé ce qui permet à SHIP1 d'interagir avec et de bloquer sa translocation vers le PI(3,4,5)P<sub>3</sub>. A l'inverse, une fois activé par un ligand, la protéine TEC est phosphorylée réduisant l'affinité de SHIP1, lui permettant de se lier au PI(3,4,5)P<sub>3</sub> (Tomlinson et al., 2004).

En fonction du contexte, l'effet de SHIP2 sur la voie MAPK/ERK pourrait être aussi médié par la fonction catalytique de la protéine. Le PI(3,4,5)P<sub>3</sub> pourrait induire le recrutement membranaire de domaines d'homologie de la pleckstrine (PH) liés à d'autres protéines qu'AKT, ce qui amplifierait l'activation de facteur de croissance lié à RAS, comme rapporté pour la voie du récepteur aux antigènes des lymphocytes (Readinger et al., 2009) et suggéré pour HGF et VEGF dans les cellules endothéliales lymphatiques (Agollah et al., 2014).

Par conséquent, l'identification du mécanisme exact par lequel SHIP2 régule la voie MAPK passera par l'identification des fonctions non-catalytiques de la protéine. Dans ce cadre, il pourrait être intéressant de réaliser des immunoprécipitations et de la spectrométrie de masse afin de comparer les résultats avec la protéine sauvage dans différentes conditions de stimulation et voir s'il y a une modification éventuelle de l'affinité de la protéine SHIP2 Δ avec des partenaires protéiques. L'utilisation de *Short hairpin RNA* (shRNA) ciblant des partenaires connus à SHIP2 permettrait de compléter ces résultats.

## Conclusions

La souris SHIP2<sup>Δ/Δ</sup> se caractérise par l'expression diminuée d'une protéine SHIP2 tronquée dépourvue d'activité catalytique. Cette souris présente un retard de croissance, une dysmorphie faciale et un raccourcissement des os longs. La plaque de croissance des os longs exhibe des anomalies structurales se traduisant notamment par une réduction de la taille et de la minéralisation de la zone hypertrophique ainsi que la formation des travées osseuses. La plupart des éléments du phénotype murin sont compatibles avec les anomalies identifiées chez les patients opsismodysplasiques rendant ce modèle pertinent pour l'étude de cette maladie, tout en tenant compte qu'il présente une sévérité moindre.

Dans le cadre de l'ossification endochondrale, SHIP2 contrôle la différenciation hypertrophique des chondrocytes et la minéralisation de la MEC en inhibant la cascade de signalisation MAPK/ERK via un mécanisme qui reste à déterminer. Il semble par ailleurs exister un lien entre SHIP2 et l'ostéocalcine.

Bien que de nombreuses incertitudes persistent dans notre compréhension du phénotype de la souris SHIP2<sup>Δ/Δ</sup>, l'ensemble des traits phénotypiques observés après invalidation de SHIP2 chez la souris reflète probablement la complexité des fonctions de la protéine in vivo. En effet, celle-ci semble contrôler les concentrations de plusieurs phosphoinositides et être capable d'interagir avec de multiples partenaires protéiques différemment en fonction du contexte cellulaire.





---

# Bibliographie

---



- Abad, V., Meyers, J. L., Weise, M., Gafni, R. I., Barnes, K. M., Nilsson, O., Bacher, J. D., & Baron, J. (2002). The Role of the Resting Zone in Growth Plate Chondrogenesis. *Endocrinology*, 143(5), 1851–1857.
- Abe, N., Inoue, T., Galvez, T., Klein, L., & Meyer, T. (2008). Dissecting the role of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> in endocytosis and recycling of the transferrin receptor. *Journal of Cell Science*, 121(9), 1488–1494.
- Accardi, G., Virruso, C., Balistreri, C. R., Emanuele, F., Licastro, F., Monastero, R., Porcellini, E., Vasto, S., Verga, S., Caruso, C., & Candore, G. (2014). SHIP2: A “NEW” Insulin Pathway Target for Aging Research. *Rejuvenation Research*, 17(2), 221–225.
- Addison, W. N., Azari, F., Sørensen, E. S., Kaartinen, M. T., & McKee, M. D. (2007). Pyrophosphate inhibits mineralization of osteoblast cultures by binding to mineral, up-regulating osteopontin, and inhibiting alkaline phosphatase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 282(21), 15872–15883.
- Addison, W. N., Masica, D. L., Gray, J. J., & McKee, M. D. (2010). Phosphorylation-dependent inhibition of mineralization by osteopontin ASARM peptides is regulated by PHEX cleavage. *Journal of Bone and Mineral Research*, 25(4), 695–705.
- Aghajanian, P., & Mohan, S. (2018). The art of building bone: Emerging role of chondrocyte-to-osteoblast transdifferentiation in endochondral ossification. *Bone Research*, 6(1).
- Agollah, G. D., Gonzalez-Garay, M. L., Rasmussen, J. C., Tan, I. C., Aldrich, M. B., Darne, C., Fife, C. E., Guilliod, R., Maus, E. A., King, P. D., & Sevic-Muraca, E. M. (2014). Evidence for SH2 domain-containing 5' -Inositol phosphatase-2 (SHIP2) contributing to a lymphatic dysfunction. *PLoS ONE*, 9(11).
- Akkiraju, H., & Nohe, A. (2015). Role of chondrocytes in cartilage formation, progression of osteoarthritis and cartilage regeneration. In *Journal of Developmental Biology* (Vol. 3, Issue 4, pp. 177–192). MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- Al Kaissi, A., Chehida, F. Ben, Ghachem, M. Ben, Grill, F., & Klaushofer, K. (2009). Atlanto-axial segmentation defects and os odontoideum in two male siblings with opsismodysplasia. *Skeletal Radiology*, 38(3), 293–296.
- Amano, K., Hata, K., Sugita, A., Takigawa, Y., Ono, K., Wakabayashi, M., Kogo, M., Nishimura, R., & Yoneda, T. (2009). Sox9 family members negatively regulate maturation and calcification of chondrocytes through up-regulation of parathyroid hormone-related protein. *Molecular Biology of the Cell*, 20(21), 4541–4551.
- Amizuka, N. (2012). Histology of epiphyseal cartilage calcification and endochondral ossification. *Frontiers in Bioscience*, E4(1), 2085.
- Anderson, H. C., Garimella, R., & Tague, S. E. (2005). The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization. In *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* (Vol. 10, pp. 822–837). Front Biosci.
- Anderson, H. C., Mulhall, D., & Garimella, R. (2010). Role of extracellular membrane vesicles in the pathogenesis of various diseases, including cancer, renal diseases, atherosclerosis, and arthritis. In *Laboratory Investigation* (Vol. 90, Issue 11, pp. 1549–1557). Lab Invest.
- Andrzejowski, P., & Giannoudis, P. V. (2019). *The “diamond concept” for long bone non-union management*.
- Antignano, F., Ibaraki, M., Kim, C., Ruschmann, J., Zhang, A., Helgason, C. D., & Krystal, G. (2010). SHIP Is Required for Dendritic Cell Maturation. *The Journal of Immunology*, 184(6), 2805–2813.
- Aoki, K., Nakamura, T., Inoue, T., Meyer, T., & Matsuda, M. (2007). An essential role for the SHIP2-dependent negative feedback loop in neuritogenesis of nerve growth factor-stimulated PC12 cells. *Journal of Cell Biology*, 177(5), 817–827.
- Artemenko, Gagnon, A., Ibrahim, S., & Sorisky, A. (2007). Regulation of PDGF-stimulated SHIP2 tyrosine phosphorylation and association with Shc in 3T3-L1 preadipocytes. *Journal of Cellular Physiology*, 211(3), 598–607.
- Artemenko, Gagnon, A., & Sorisky, A. (2009). Catalytically inactive SHIP2 inhibits proliferation by attenuating pdgf signaling in 3T3-L1 preadipocytes. *Journal of Cellular Physiology*, 218(1), 228–236.
- Attree, O., Olivos, I. M., Okabe, I., Bailey, L. C., Nelson, D. L., Lewis, R. A., McInnes, R. R., & Nussbaum, R. L. (1992). The Lowe’s oculocerebrorenal syndrome gene encodes a protein highly homologous to inositol polyphosphate-5-phosphatase. *Nature*, 358(6383), 239–242.

- Avruch, J., Khokhlatchev, A., Kyriakis, J. M., Luo, Z., Tzivion, G., Vavvas, D., & Zhang, X. F. (2001). Ras activation of the Raf kinase: Tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. In *Recent Progress in Hormone Research* (Vol. 56, pp. 127–155). Endocrine Society.
- Awad, A., Sar, S., Barré, R., Cariven, C., Marin, M., Salles, J. P., Erneux, C., Samuel, D., & Gassama-Diagne, A. (2013). FSHIP2 regulates epithelial cell polarity through its lipid product, which binds to Dlg1, a pathway subverted by hepatitis C virus core protein. *Molecular Biology of the Cell*, 24(14), 2171–2185.
- Aygun, C., Celik, F. C., Nural, M. S., Azak, E., Kucukoduk, Ş., Ogur, G., & Incesu, L. (2012). Simplified gyral pattern with cerebellar hypoplasia in Sedaghatian type spondylometaphyseal dysplasia: A clinical report and review of the literature. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 158 A(6), 1400–1405.
- Bae, Y. H., Ding, Z., Das, T., Wells, A., Gertler, F., & Roy, P. (2010). Profilin1 regulates PI(3,4)P2 and lamellipodin accumulation at the leading edge thus influencing motility of MDA-MB-231 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(50), 21547–21552.
- Bailey, S., Karsenty, G., Gundberg, C., & Vashishth, D. (2017). Osteocalcin and osteopontin influence bone morphology and mechanical properties. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1409(1), 79–84.
- Balla, T. (2013). Phosphoinositides: Tiny Lipids With Giant Impact on Cell Regulation. *Physiological Reviews*, 93(3), 1019–1137.
- Bandaru, P., Kondo, Y., & Kuriyan, J. (2019). The interdependent activation of son-of-sevenless and ras. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 9(2).
- Bandyopadhyay, A., Tsuji, K., Cox, K., Harfe, B. D., Rosen, V., & Tabin, C. J. (2006). Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. *PLoS Genetics*, 2(12), 2116–2130.
- Baujat, G., Legeai-Mallet, L., Finidori, G., Cormier-Daire, V., & Le Merrer, M. (2008). Achondroplasia. In *Best Practice and Research: Clinical Rheumatology* (Vol. 22, Issue 1, pp. 3–18). Best Pract Res Clin Rheumatol.
- Beemer, F. A., & Kozlowski, K. S. (1994). Additional case of opsismodysplasia supporting autosomal recessive inheritance. *American Journal of Medical Genetics*, 49(3), 344–347.
- Below, J. E., Earl, D. L., Shively, K. M., McMillin, M. J., Smith, J. D., Turner, E. H., Stephan, M. J., Al-Gazali, L. I., Hertecant, J. L., Chitayat, D., Unger, S., Cohn, D. H., Krakow, D., Swanson, J. M., Faustman, E. M., Shendure, J., Nickerson, D. A., & Bamshad, M. J. (2013). Whole-genome analysis reveals that mutations in inositol polyphosphate phosphatase-like 1 cause opsismodysplasia. *American Journal of Human Genetics*, 92(1), 137–143.
- Berridge, M. J., & Irvine, R. F. (1984). Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, 312(5992), 315–321.
- Berridge, M. J., & Irvine, R. F. (1989). Inositol phosphates and cell signalling. In *Nature* (Vol. 341, Issue 6239, pp. 197–205).
- Bi, Deng, J. M., Zhang, Z., Behringer, R. R., & de Crombrughe, B. (1999). Sox9 is required for cartilage formation. *Nature Genetics*, 22, 85.
- Bi, Huang, W., Whitworth, D. J., Deng, J. M., Zhang, Z., Behringer, R. R., & de Crombrughe, B. (2001). Haploinsufficiency of Sox9 results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(12), 6698–6703.
- Bielas, S. L., Silhavy, J. L., Brancati, F., Kisseleva, M. V., Al-Gazali, L., Sztriha, L., Bayoumi, R. A., Zaki, M. S., Abdel-Aleem, A., Rosti, R. O., Kayserili, H., Swistun, D., Scott, L. C., Bertini, E., Boltshauser, E., Fazzi, E., Travaglini, L., Field, S. J., Gayral, S., ... Gleeson, J. G. (2009). Mutations in INPP5E, encoding inositol polyphosphate-5-phosphatase E, link phosphatidyl inositol signaling to the ciliopathies. *Nature Genetics*, 41(9), 1032–1036.
- Bird, I. M., Kim, S. H., Schweppe, D. K., Caetano-Lopes, J., Robling, A. G., Charles, J. F., Gygi, S. P., Warman, M. L., & Smits, P. J. (2018). The skeletal phenotype of achondrogenesis type 1A is caused exclusively by cartilage defects. *Development (Cambridge)*, 145(1).
- Blero, D., De Smedt, F., Pesesse, X., Paternotte, N., Moreau, C., Payrastra, B., & Erneux, C. (2001). The SH2 domain

- containing inositol 5-phosphatase SHIP2 controls phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate levels in CHO-IR cells stimulated by insulin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282(3), 839–843.
- Blero, D., Payrastre, B., Schurmans, S., & Erneux, C. (2007). Phosphoinositide phosphatases in a network of signalling reactions. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 455(1), 31–44.
- Blero, D., Zhang, J., Pesesse, X., Payrastre, B., Dumont, J. E., Schurmans, S., & Erneux, C. (2005). Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate modulation in SHIP2-deficient mouse embryonic fibroblasts. *FEBS Journal*, 272(10), 2512–2522.
- Blunsom, N. J., & Cockcroft, S. (2020). Phosphatidylinositol synthesis at the endoplasmic reticulum. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* (Vol. 1865, Issue 1, p. 158471). Elsevier B.V.
- Bohdanowicz, M., Balkin, D. M., De Camilli, P., & Grinstein, S. (2012). Recruitment of OCRL and Inpp5B to phagosomes by Rab5 and APPL1 depletes phosphoinositides and attenuates Akt signaling. *Molecular Biology of the Cell*, 23(1), 176–187.
- Boonrungsiman, S., Gentleman, E., Carzaniga, R., Evans, N. D., McComb, D. W., Porter, A. E., & Stevens, M. M. (2012). The role of intracellular calcium phosphate in osteoblast-mediated bone apatite formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(35), 14170–14175.
- Boraschi-Diaz, I., Tauer, J. T., El-Rifai, O., Guillemette, D., Lefebvre, G., Rauch, F., Ferron, M., & Komarova, S. V. (2017). Metabolic phenotype in the mouse model of osteogenesis imperfecta. *Journal of Endocrinology*, 234(3), 279–289.
- Boskey, Gadaleta, S., Gundberg, C., Doty, S. B., Ducy, P., & Karsenty, G. (1998). Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin. *Bone*, 23(3), 187–196.
- Boskey, Maresca, M., Ullrich, W., Doty, S. B., Butler, W. T., & Prince, C. W. (1993). Osteopontin-hydroxyapatite interactions in vitro: inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel. *Bone and Mineral*, 22(2), 147–159.
- Boucrot, E., Ferreira, A. P. A., Almeida-Souza, L., Debard, S., Vallis, Y., Howard, G., Bertot, L., Sauvonnet, N., & McMahon, H. T. (2015). Endophilin marks and controls a clathrin-independent endocytic pathway. *Nature*, 517(7535), 460–465.
- Braicu, C., Buse, M., Busuioc, C., Drula, R., Gulei, D., Raduly, L., Rusu, A., Irimie, A., Atanasov, A. G., Slaby, O., Ionescu, C., & Berindan-Neagoe, I. (2019). A comprehensive review on MAPK: A promising therapeutic target in cancer. In *Cancers* (Vol. 11, Issue 10). MDPI AG.
- Breeland, G., & Menezes, R. G. (2019). Embryology, Bone Ossification. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Brognard, J., Sieracki, E., Gao, T., & Newton, A. C. (2007). PHLPP and a Second Isoform, PHLPP2, Differentially Attenuate the Amplitude of Akt Signaling by Regulating Distinct Akt Isoforms. *Molecular Cell*, 25(6), 917–931.
- Bruhns, P., Vély, F., Malbec, O., Fridman, W. H., Vivier, E., & Daëron, M. (2000). Molecular basis of the recruitment of the SH2 domain-containing inositol 5-phosphatases SHIP1 and SHIP2 by FcγRIIB. *Journal of Biological Chemistry*, 275(48), 37357–37364.
- Buettner, R., Ottinger, I., Gerhardt-Salbert, C., Wrede, C. E., Schölmerich, J., & Bollheimer, L. C. (2007). Antisense oligonucleotides against the lipid phosphatase SHIP2 improve muscle insulin sensitivity in a dietary rat model of the metabolic syndrome. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 292(6), E1871–E1878.
- Bülbül, Kayserili, H., Bilge, I., Nurçin Saka, M., & Yüksel Apak, F. D. (2005). Opsismodisplazi ve tubülopati birlikteliği: Bir vaka takdimi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 48(3).
- Burke, J. E. (2018). Structural Basis for Regulation of Phosphoinositide Kinases and Their Involvement in Human Disease. In *Molecular Cell* (Vol. 71, Issue 5, pp. 653–673). Cell Press.
- Butti, R., Das, S., Gunasekaran, V. P., Yadav, A. S., Kumar, D., & Kundu, G. C. (2018). Receptor tyrosine kinases (RTKs) in breast cancer: Signaling, therapeutic implications and challenges. In *Molecular Cancer* (Vol. 17, Issue 1, pp. 1–18). BioMed Central Ltd.
- Byron, A., Humphries, J. D., Craig, S. E., Knight, D., & Humphries, M. J. (2012). Proteomic analysis of α4β1 integrin adhesion complexes reveals α-subunit-dependent protein recruitment. *Proteomics*, 12(13), 2107–2114.
- Cain, R. J., & Ridley, A. J. (2009). Phosphoinositide 3-kinases in cell migration. *Biology of the Cell*, 101(1), 13–29.

- Calder, A. D. (2015). Radiology of Osteogenesis Imperfecta, Rickets and Other Bony Fragility States. In *Endocrine Development* (Vol. 28, pp. 56–71). S. Karger AG.
- Cao, H., Alrejaye, N., Klein, O. D., Goodwin, A. F., & Oberoi, S. (2017). A review of craniofacial and dental findings of the RASopathies. In *Orthodontics and Craniofacial Research* (Vol. 20, Issue Suppl 1, pp. 32–38). Blackwell Publishing Ltd.
- Caunt, C. J., & Keyse, S. M. (2013). Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs): Shaping the outcome of MAP kinase signalling. In *FEBS Journal* (Vol. 280, Issue 2, pp. 489–504).
- Chagin, A. S., & Newton, P. T. (2019). Postnatal skeletal growth is driven by the epiphyseal stem cell niche: potential implications to pediatrics. In *Pediatric Research* (pp. 1–5). Springer Nature.
- Chan, Liu, Y. J., Huang, G. S., Lin, M. F., Huang, S., Chang, Y. C., & Jiang, C. C. (2011). Relationship of idiopathic osteonecrosis of the femoral head to perfusion changes in the proximal femur by dynamic contrast-enhanced MRI. *American Journal of Roentgenology*, 196(3), 637–643.
- Chandraratnam, S., Sawai, A., Scaltriti, M., Rodrik-Outmezguine, V., Grbovic-Huezo, O., Serra, V., Majumder, P. K., Baselga, J., & Rosen, N. (2011). AKT inhibition relieves feedback suppression of receptor tyrosine kinase expression and activity. *Cancer Cell*, 19(1), 58–71.
- Chang-Ileto, B., & Di Paolo, G. (2009). Synaptojanin. In *Encyclopedia of Neuroscience* (pp. 809–814). Elsevier Ltd.
- Chang-Ileto, Belle, Frere, S. G., Chan, R. B., Voronov, S. V., Roux, A., & Di Paolo, G. (2011). Synaptojanin 1-Mediated PI(4,5)P<sub>2</sub> Hydrolysis Is Modulated by Membrane Curvature and Facilitates Membrane Fission. *Developmental Cell*, 20(2), 206–218.
- Chang, C. Y., Rosenthal, D. I., Mitchell, D. M., Handa, A., Kattapuram, S. V., & Huang, A. J. (2016). Imaging findings of metabolic bone disease. *Radiographics*, 36(6), 1871–1887.
- Chen, Guo, R., Itoh, S., Moreno, L., Rosenthal, E., Zappitelli, T., Zirngibl, R. A., Flenniken, A., Cole, W., Grynepas, M., Osborne, L. R., Vogel, W., Adamson, L., Rossant, J., & Aubin, J. E. (2014). First Mouse Model for Combined Osteogenesis Imperfecta and Ehlers-Danlos Syndrome. *Journal of Bone and Mineral Research*, 29(6), 1412–1423.
- Chen, L., Adar, R., Yang, X., Monsonego, E. O., Li, C., Hauschka, P. V., Yayon, A., & Deng, C. X. (1999). Gly369Cys mutation in mouse FGFR3 causes achondroplasia by affecting both chondrogenesis and osteogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 104(11), 1517–1525.
- Chen, Shi, Y., Regan, J., Karuppaiah, K., Ornitz, D. M., & Long, F. (2014). Osx-Cre targets multiple cell types besides osteoblast lineage in postnatal mice. *PLoS ONE*, 9(1).
- Chen, Wakimoto, H., Conner, D., Araki, T., Yuan, T., Roberts, A., Seidman, C. E., Bronson, R., Neel, B. G., Seidman, J. G., & Kuchelapati, R. (2010). Activation of multiple signaling pathways causes developmental defects in mice with a Noonan syndrome-associated Sos1 mutation. *Journal of Clinical Investigation*, 120(12), 4353–4365.
- Chen, Yue, S. X., Zhou, G., Greenfield, E. M., & Murakami, S. (2015). ERK1 and ERK2 regulate chondrocyte terminal differentiation during endochondral bone formation. *Journal of Bone and Mineral Research*, 30(5), 765–774.
- Chen, Z., Zhang, Z., Guo, L., Wei, X., Zhang, Y., Wang, X., & Wei, L. (2020). The role of histone deacetylase 4 during chondrocyte hypertrophy and endochondral bone development. *Bone & Joint Research*, 9(2), 82–89.
- Cheng, C. C., Uchiyama, Y., Hiyama, A., Gajghate, S., Shapiro, I. M., & Risbud, M. V. (2009). PI3K/AKT regulates aggrecan gene expression by modulating Sox9 expression and activity in nucleus pulposus cells of the intervertebral disc. *Journal of Cellular Physiology*, 221(3), 668–676.
- Chew, C. L., Chen, M., & Pandolfi, P. P. (2016). Endosome and INPP4B. In *Oncotarget* (Vol. 7, Issue 1, pp. 5–6). Impact Journals, LLC.
- Chi, Y., Zhou, B., Wang, W. Q., Chung, S. K., Kwon, Y. U., Ahn, Y. H., Chang, Y. T., Tsujishita, Y., Hurley, J. H., & Zhang, Z. Y. (2004). Comparative mechanistic and substrate specificity study of inositol polyphosphate 5-phosphatase *Schizosaccharomyces pombe* synaptojanin and SHIP2. *Journal of Biological Chemistry*, 279(43), 44987–44995.
- Clarke, B. (2008). Normal bone anatomy and physiology. In *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*:

- Vol. 3 Suppl 3 (Issue Supplement 3, pp. 131–139). American Society of Nephrology.
- Cooper, K. L., Oh, S., Sung, Y., Dasari, R. R., Kirschner, M. W., & Tabin, C. J. (2013). Multiple phases of chondrocyte enlargement underlie differences in skeletal proportions. *Nature*, 495(7441), 375–378.
- Cormier-Daire, V., Delezoide, A. L., Philip, N., Marcorelles, P., Casas, K., Hillion, Y., Faivre, L., Rimoin, D. L., Munnich, A., Maroteaux, P., & Le Merrer, M. (2003). Clinical, radiological, and chondro-osseous findings in opsismodysplasia: Survey of a series of 12 unreported cases [1]. In *Journal of Medical Genetics* (Vol. 40, Issue 3, pp. 195–200).
- Cremona, O., Di Paolo, G., Wenk, M. R., Lüthi, A., Kim, W. T., Takei, K., Daniell, L., Nemoto, Y., Shears, S. B., Flavell, R. A., McCormick, D. A., & De Camilli, P. (1999). Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell*, 99(2), 179–188.
- Cuevas, B. D., Abell, A. N., & Johnson, G. L. (2007). Role of mitogen-activated protein kinase kinase kinases in signal integration. In *Oncogene* (Vol. 26, Issue 22, pp. 3159–3171).
- Cui, L., Houston, D. A., Farquharson, C., & MacRae, V. E. (2016). Characterisation of matrix vesicles in skeletal and soft tissue mineralisation. In *Bone* (Vol. 87, pp. 147–158). Elsevier Inc.
- Daëron, M., & Lesourne, R. (2006). Negative Signaling in Fc Receptor Complexes. In *Advances in Immunology* (Vol. 89, pp. 39–86). Academic Press.
- Dao, D. Y., Jonason, J. H., Zhang, Y., Hsu, W., Chen, D., Hilton, M. J., & O’Keefe, R. J. (2012). Cartilage-specific  $\beta$ -catenin signaling regulates chondrocyte maturation, generation of ossification centers, and perichondrial bone formation during skeletal development. *Journal of Bone and Mineral Research*, 27(8), 1680–1694.
- Day, R. C., & Beck, C. W. (2011). Transdifferentiation from cornea to lens in *Xenopus laevis* depends on BMP signalling and involves upregulation of Wnt signalling. *BMC Developmental Biology*, 11.
- De Meyts, P. (2000). The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network. In *Endotext*. MDText.com, Inc.
- De Schutter, J., Guillabert, A., Imbault, V., Degraef, C., Emeux, C., Communi, D., & Pirson, I. (2009). SHIP2 (SH2 domain-containing inositol phosphatase 2) SH2 domain negatively controls SHIP2 monoubiquitination in response to epidermal growth factor. *Journal of Biological Chemistry*, 284(52), 36062–36076.
- Dél  ris, P., Bacqueville, D., Gayral, S., Carrez, L., Salles, J. P., Perret, B., & Breton-Douillon, M. (2003). SHIP-2 and PTEN are expressed and active in vascular smooth muscle cell nuclei, but only SHIP-2 is associated with nuclear speckles. *Journal of Biological Chemistry*, 278(40), 38884–38891.
- Deneubourg, L., Elong Edimo, W., Moreau, C., Vanderwinden, J. M., & Erneux, C. (2014). Phosphorylated SHIP2 on Y1135 localizes at focal adhesions and at the mitotic spindle in cancer cell lines. *Cellular Signalling*, 26(6), 1193–1203.
- Deneubourg, L., Vanderwinden, J. M., & Erneux, C. (2010). Regulation of SHIP2 function through plasma membrane interaction. *Advances in Enzyme Regulation*, 50(1), 262–271.
- Dephoure, N., Zhou, C., Vill  n, J., Beausoleil, S. A., Bakalarski, C. E., Elledge, S. J., & Gygi, S. P. (2008). A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(31), 10762–10767.
- Di Paolo, G., & De Camilli, P. (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. In *Nature* (Vol. 443, Issue 7112, pp. 651–657). Nature Publishing Group.
- Dickson, E. J., Jensen, J. B., & Hille, B. (2014). Golgi and plasma membrane pools of PI(4)P contribute to plasma membrane PI(4,5)P2 and maintenance of KCNQ2/3 ion channel current. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(22), E2281–90.
- Dougherty, M  ller, J., Ritt, D. A., Zhou, M., Zhou, X. Z., Copeland, T. D., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., Lu, K. P., & Morrison, D. K. (2005). Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation. *Molecular Cell*, 17(2), 215–224.
- Duan, Murata, Y., Liu, Y., Nicolae, C., Olsen, B. R., & Berendsen, A. D. (2015). Vegfa regulates perichondrial vascularity and osteoblast differentiation in bone development. *Development (Cambridge)*, 142(11), 1984–1991.
- Dubois, E., Jacoby, M., Blockmans, M., Pernot, E., Schiffmann, S. N., Foukas, L. C., Henquin, J. C., Vanhaesebroeck, B., Erneux, C., & Schurmans, S. (2012). Developmental defects and rescue from glucose intolerance of a catalytically-



- inactive novel Ship2 mutant mouse. *Cellular Signalling*, 24(11), 1971–1980.
- Ducy, P., Desbois, C., Boyce, B., Pinero, G., Story, B., Dunstan, C., Smith, E., Bonadio, J., Goldstein, S., Gundberg, C., Bradley, A., & Karsenty, G. (1996). Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature*, 382(6590), 448–452.
- Dumaz, N., & Marais, R. (2003). Protein kinase A blocks Raf-1 activity by stimulating 14-3-3 binding and blocking Raf-1 interaction with Ras. *Journal of Biological Chemistry*, 278(32), 29819–29823.
- Dyson, J. M., O'Malley, C. J., Becanovic, J., Munday, A. D., Berndt, M. C., Coghill, I. D., Nandurkar, H. H., Ooms, L. M., & Mitchell, C. A. (2001). The SH2-containing inositol polyphosphate 5-phosphatase, SHIP-2, binds filamin and regulates submembraneous actin. *Journal of Cell Biology*, 155(6), 1065–1079.
- Eblen, S. T. (2018). Extracellular-Regulated Kinases: Signaling From Ras to ERK Substrates to Control Biological Outcomes. In *Advances in Cancer Research* (Vol. 138, pp. 99–142). Academic Press Inc.
- Eblen, S. T., Slack-Davis, J. K., Tarcsafalvi, A., Parsons, J. T., Weber, M. J., & Catling, A. D. (2004). Mitogen-Activated Protein Kinase Feedback Phosphorylation Regulates MEK1 Complex Formation and Activation during Cellular Adhesion. *Molecular and Cellular Biology*, 24(6), 2308–2317.
- Ebner, M., Lučić, I., Leonard, T. A., & Yudushkin, I. (2017). PI(3,4,5)P<sub>3</sub> Engagement Restricts Akt Activity to Cellular Membranes. *Molecular Cell*, 65(3), 416–431.e6.
- Egawa, S., Miura, S., Yokoyama, H., Endo, T., & Tamura, K. (2014). Growth and differentiation of a long bone in limb development, repair and regeneration. *Development, Growth & Differentiation*, 56(5), 410–424.
- Elong Edimo, W., Derua, R., Janssens, V., Nakamura, T., Vanderwinden, J. M., Waelkens, E., & Erneux, C. (2011). Evidence of SHIP2 Ser132 phosphorylation, its nuclear localization and stability. *Biochemical Journal*, 439(3), 391–401.
- Elong Edimo, W., Ghosh, S., Derua, R., Janssens, V., Waelkens, E., Vanderwinden, J.-M., Robe, P., & Erneux, C. (2016a). SHIP2 controls plasma membrane PI(4,5)P<sub>2</sub> thereby participating in the control of cell migration in 1321 N1 glioblastoma cells. *Journal of Cell Science*, 129(6), 1101–1114.
- Elong Edimo, W., Ghosh, S., Derua, R., Janssens, V., Waelkens, E., Vanderwinden, J. M., Robe, P., & Erneux, C. (2016b). SHIP2 controls plasma membrane PI(4,5)P<sub>2</sub> thereby participating in the control of cell migration in 1321 N1 glioblastoma cells. *Journal of Cell Science*, 129(6), 1101–1114.
- Elong Edimo, W., Janssens, V., Waelkens, E., & Erneux, C. (2012). Reversible Ser/Thr SHIP phosphorylation: A new paradigm in phosphoinositide signalling?: Targeting of SHIP1/2 phosphatases may be controlled by phosphorylation on Ser and Thr residues. *BioEssays*, 34(8), 634–642.
- Erneux, C., Edimo, W. E., Deneubourg, L., & Pirson, I. (2011). SHIP2 multiple functions: A balance between a negative control of PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> level, a positive control of PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> production, and intrinsic docking properties. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(9), 2203–2209.
- Fafilek, B., Balek, L., Bosakova, M. K., Varecha, M., Nita, A., Gregor, T., Gudernova, I., Krenova, J., Ghosh, S., Piskacek, M., Jonatova, L., Cernohorsky, N. H., Zieba, J. T., Kostas, M., Haugsten, E. M., Wesche, J., Erneux, C., Trantirek, L., Krakow, D., & Krejci, P. (2018). The inositol phosphatase SHIP2 enables sustained ERK activation downstream of FGF receptors by recruiting Src kinases. *Science Signaling*, 11(548).
- Farnum, C. E., Lee, R., O'Hara, K., & Urban, J. P. G. (2002). Volume increase in growth plate chondrocytes during hypertrophy: The contribution of organic osmolytes. *Bone*, 30(4), 574–581.
- Fedde, K. N. (1992). Human osteosarcoma cells spontaneously release matrix-vesicle-like structures with the capacity to mineralize. *Bone and Mineral*, 17(2), 145–151.
- Feist, C., Holden, P., & Fitzgerald, J. (2016). Novel compound heterozygous mutations in inositol polyphosphate phosphatase-like 1 in a family with severe opsismodysplasia. *Clinical Dysmorphology*, 25(4), 152–155.
- Fong, D. C., Brauweiler, A., Minskoff, S. A., Bruhns, P., Tamir, I., Mellman, I., Daeron, M., & Cambier, J. C. (2000). Mutational Analysis Reveals Multiple Distinct Sites Within Fcγ Receptor IIB That Function in Inhibitory Signaling. *The Journal of Immunology*, 165(8), 4453–4462.

- Fradet, A., & Fitzgerald, J. (2017). INPPL1 gene mutations in opsismodysplasia. *Journal of Human Genetics*, 62(2), 135–140.
- Fu, Fan, W., Pu, X., Ni, H., Zhang, W., Chang, F., Gong, L., Xiong, L., Wang, J., & Gu, X. (2013). Elevated expression of SHIP2 correlates with poor prognosis in non-small cell lung cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 6(10), 2185–2191.
- Fu, Gu, X., Ni, H., Zhang, W., Chang, F., Gong, L., Chen, X., Li, J., Qiu, L., Shi, C., & Bao, J. (2013). High expression of inositol polyphosphate phosphatase-like 1 associates with unfavorable survival in hepatocellular carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 6(11), 2515–2522.
- Fu, Lin, R.-J., Yu, J., Chang, W.-W., Liao, G.-S., Chang, W.-Y., Tseng, L.-M., Tsai, Y.-F., Yu, J.-C., & Yu, A. L. (2014). A Novel Oncogenic Role of Inositol Phosphatase SHIP2 in ER-Negative Breast Cancer Stem Cells: Involvement of JNK/Vimentin Activation. *STEM CELLS*, 32(8), 2048–2060.
- Fuhler, G. M., Brooks, R., Toms, B., Iyer, S., Gengo, E. A., Park, M. Y., Gumbleton, M., Viernes, D. R., Chisholm, J. D., & Kerr, W. G. (2012). Therapeutic potential of SH2 domain-containing inositol-5'-phosphatase 1 (SHIP1) and SHIP2 inhibition in cancer. *Molecular Medicine*, 18(1), 65–75.
- Fukai, A., Kawamura, N., Saito, T., Oshima, Y., Ikeda, T., Kugimiya, F., Higashikawa, A., Yano, F., Ogata, N., Nakamura, K., Chung, U. Il, & Kawaguchi, H. (2010). Akt1 in murine chondrocytes controls cartilage calcification during endochondral ossification under physiologic and pathologic conditions. *Arthritis and Rheumatism*, 62(3), 826–836.
- Fukui, K., Wada, T., Kagawa, S., Nagira, K., Ikubo, M., Ishihara, H., Kobayashi, M., & Sasaoka, T. (2005). Impact of the liver-specific expression of SHIP2 (SH2-containing inositol 5'-phosphatase 2) on insulin signaling and glucose metabolism in mice. *Diabetes*, 54(7), 1958–1967.
- Furuichi, T., Kayserili, H., Hiraoka, S., Nishimura, G., Ohashi, H., Alanay, Y., Lerena, J. C., Aslanger, A. D., Koseki, H., Cohn, D. H., Superti-Furga, A., Unger, S., & Ikegawa, S. (2009). Identification of loss-of-function mutations of SLC35D1 in patients with Schneckenbecken dysplasia, but not with other severe spondylodysplastic dysplasias group diseases. *Journal of Medical Genetics*, 46(8), 562–568.
- Gericke, A., Leslie, N. R., Lösche, M., & Ross, A. H. (2013). PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Mediated Cell Signaling: Emerging Principles and PTEN as a Paradigm for Regulatory Mechanism. In *Advances in experimental medicine and biology* (Vol. 991, pp. 85–104). NIH Public Access.
- Ghosh, S., Huber, C., Siour, Q., Sousa, S. B., Wright, M., Cormier-Daire, V., & Erneux, C. (2017). Fibroblasts derived from patients with opsismodysplasia display SHIP2-specific cell migration and adhesion defects. *Human Mutation*, 38(12), 1731–1739.
- Gialeli, C., Theocharis, A. D., & Karamanos, N. K. (2011). Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. In *FEBS Journal* (Vol. 278, Issue 1, pp. 16–27).
- Giuriato, S., Blero, D., Robaye, B., Bruyns, C., Payrastra, B., & Erneux, C. (2002). SHIP2 overexpression strongly reduces the proliferation rate of K562 erythroleukemia cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 296(1), 106–110.
- Goldring, S. R. (2015). The osteocyte: Key player in regulating bone turnover. In *RMD Open* (Vol. 1, Issue Suppl 1). BMJ Publishing Group.
- Golub, E. E., & Boesze-Battaglia, K. (2007). The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Current Opinion in Orthopaedics*, 18(5), 444–448.
- Goñi, G. M., Epifano, C., Boskovic, J., Camacho-Artacho, M., Zhou, J., Bronowska, A., Martín, M. T., Eck, M. J., Kremer, L., Gräter, F., Gervasio, F. L., Perez-Moreno, M., & Lietha, D. (2014). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate triggers activation of focal adhesion kinase by inducing clustering and conformational changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(31), E3177.
- Goulden, B. D., Pacheco, J., Dull, A., Zewe, J. P., Deiters, A., & Hammond, G. R. V. (2019). A high-avidity biosensor reveals plasma membrane PI(3,4)P<sub>2</sub> is predominantly a class I PI3K signaling product. *Journal of Cell Biology*, 218(3), 1066–1079.

- Grabon, A., Bankaitis, V. A., & McDermott, M. I. (2019). The interface between phosphatidylinositol transfer protein function and phosphoinositide signaling in higher eukaryotes. In *Journal of Lipid Research* (Vol. 60, Issue 2, pp. 242–268).
- Grempler, R., Zibrova, D., Schoelch, C., Van Marle, A., Rippmann, J. F., & Redemann, N. (2007). Normalization of prandial blood glucose and improvement of glucose tolerance by liver-specific inhibition of SH2 domain-containing inositol phosphatase 2 (SHIP2) in diabetic KKAy mice: SHIP2 inhibition causes insulin-mimetic effects on glycogen metabolism. *Diabetes*, 56(9), 2235–2241.
- Grigelioniene, G., Geiberger, S., Papadogiannakis, N., Mäkitie, O., Nishimura, G., Nordgren, A., & Conner, P. (2013). The phenotype range of achondrogenesis 1A. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 161(10), 2554–2558.
- Guntur, A. R., & Rosen, C. J. (2013). IGF-1 Regulation of Key Signaling Pathways in Bone. *BoneKey Reports*, 2(437), 1–6.
- Guo, Y., Pan, W., Liu, S., Shen, Z., Xu, Y., & Hu, L. (2020). ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 19(3), 1997–2007.
- Haffner, C., Di Paolo, G., Rosenthal, J. A., & de Camilli, P. (2000). Direct interaction of the 170 kDa isoform of synaptojanin 1 with clathrin and with the clathrin adaptor AP-2. *Current Biology : CB*, 10(8), 471–474.
- Haigh, J., Gerber, H., Ferrara, N., & Wagner, E. (2000). Conditional inactivation of VEGF-A in areas of collagen2a1 expression results in embryonic lethality in the heterozygous state. *Undefined*.
- Haimov, H., Shimoni, E., Brumfeld, V., Shemesh, M., Varsano, N., Addadi, L., & Weiner, S. (2020). Mineralization pathways in the active murine epiphyseal growth plate. *Bone*, 130, 115086.
- Hakim, S., Bertucci, M. C., Conduit, S. E., Vuong, D. L., & Mitchell, C. A. (2012). *Inositol Polyphosphate Phosphatases in Human Disease* (pp. 247–314).
- Hallett, S. A., Ono, W., & Ono, N. (2019). Growth plate chondrocytes: Skeletal development, growth and beyond. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 23). MDPI AG.
- Han, Y., Xu, G., Zhang, J., Yan, M., Li, X., Ma, B., Jun, L., Wang, S., & Tan, J. (2016). Leptin induces osteocalcin expression in ATDC5 cells through activation of the MAPK-ERK1/2 signaling pathway. *Oncotarget*, 7(39), 64021–64029.
- Hansen, S. D., & Mullins, R. D. (2015). Lamellipodin promotes actin assembly by clustering Ena/VASP proteins and tethering them to actin filaments. *ELife*, 4(AUGUST2015).
- Hardee, I., Soldatos, A., Davids, M., Vilboux, T., Toro, C., David, K. L., Ferreira, C. R., Nehrebecky, M., Snow, J., Thurm, A., Heller, T., Macnamara, E. F., Gunay-Aygun, M., Zein, W. M., Gahl, W. A., & Malicdan, M. C. V. (2017). Defective ciliogenesis in INPP5E-related Joubert syndrome. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 173(12), 3231–3237.
- Hargus, G., Kist, R., Kramer, J., Gerstel, D., Neitz, A., Scherer, G., & Rohwedel, J. (2008). Loss of Sox9 function results in defective chondrocyte differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro. *International Journal of Developmental Biology*, 52(4), 323–332.
- Hasegawa, T., Yamamoto, T., Tsuchiya, E., Hongo, H., Tsuboi, K., Kudo, A., Abe, M., Yoshida, T., Nagai, T., Khadiza, N., Yokoyama, A., Oda, K., Ozawa, H., de Freitas, P. H. L., Li, M., & Amizuka, N. (2017). Ultrastructural and biochemical aspects of matrix vesicle-mediated mineralization. In *Japanese Dental Science Review* (Vol. 53, Issue 2, pp. 34–45). Elsevier Ltd.
- Hata, Takahata, Y., Murakami, T., & Nishimura, R. (2017). Transcriptional Network Controlling Endochondral Ossification. *Journal of Bone Metabolism*, 24(2), 75.
- Hawkins, P. T., & Stephens, L. R. (2016). Emerging evidence of signalling roles for PI(3,4)P2 in Class I and II PI3K-regulated pathways. *Biochemical Society Transactions*, 44(1), 307–314.
- Helgason, C. D., Damen, J. E., Rosten, P., Grewal, R., Sorensen, P., Chappel, S. M., Borowski, A., Jirik, F., Krystal, G., & Humphries, R. K. (1998). Targeted disruption of SHIP leads to hemopoietic perturbations, lung pathology, and a shortened life span. *Genes and Development*, 12(11), 1610–1620.
- Heras-Sandoval, D., Pérez-Rojas, J. M., Hernández-Damián, J., & Pedraza-Chaverri, J. (2014). The role of PI3K/AKT/mTOR pathway in the modulation of autophagy and the clearance of protein aggregates in neurodegeneration. In *Cellular Signalling* (Vol. 26, Issue 12, pp. 2694–2701). Elsevier Inc.

- Hernández-Porras, I., Fabbiano, S., Schuhmacher, A. J., Aicher, A., Cañamero, M., Cámara, J. A., Cussó, L., Desco, M., Heeschen, C., Mulero, F., Bustelo, X. R., Guerra, C., & Barbacid, M. (2014). K-RasV14I recapitulates noonan syndrome in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(46), 16395–16400.
- Hichri, H., Rendu, J., Monnier, N., Coutton, C., Dorseuil, O., Poussou, R. V., Baujat, G., Blanchard, A., Nobili, F., Ranchin, B., Remesy, M., Salomon, R., Satre, V., & Lunardi, J. (2011). From lowe syndrome to Dent disease: Correlations between mutations of the OCRL1 gene and clinical and biochemical phenotypes. *Human Mutation*, 32(4), 379–388.
- Hiraoka, S., Furuichi, T., Nishimura, G., Shibata, S., Yanagishita, M., Rimoin, D. L., Superti-Furga, A., Nikkels, P. G., Ogawa, M., Katsuyama, K., Toyoda, H., Kinoshita-Toyoda, A., Ishida, N., Isono, K., Sanai, Y., Cohn, D. H., Koseki, H., & Ikegawa, S. (2007). Nucleotide-sugar transporter SLC35D1 is critical to chondroitin sulfate synthesis in cartilage and skeletal development in mouse and human. *Nature Medicine*, 13(11), 1363–1367.
- Hirsch, E., Gulluni, F., & Martini, M. (2020). Phosphoinositides in cell proliferation and metabolism. In *Advances in Biological Regulation* (Vol. 75, p. 100693). Elsevier Ltd.
- Hoang, Q. Q., Sicheri, F., Howard, A. J., & Yang, D. S. C. (2003). Bone recognition mechanism of porcine osteocalcin from crystal structure. *Nature*, 425(6961), 977–980.
- Hobbs, G. A., Der, C. J., & Rossman, K. L. (2016). RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *Journal of Cell Science*, 129(7), 1287–1292.
- Hoekstra, E., Das, A. M., Willemsen, M., Swets, M., Kuppen, P. J. K., van der Woude, C. J., Bruno, M. J., Shah, J. P., ten Hagen, T. L. M., Chisholm, J. D., Kerr, W. G., Peppelenbosch, M. P., & Fuhler, G. M. (2016). Lipid phosphatase SHIP2 functions as oncogene in colorectal cancer by regulating PKB activation. *Oncotarget*, 7(45), 73525–73540.
- Holderfield, M., Deuker, M. M., McCormick, F., & McMahon, M. (2014). Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 14, Issue 7, pp. 455–467). Nature Publishing Group.
- Hoshino, Jourquin, J., Emmons, S. W., Miller, T., Goldgof, M., Costello, K., Tyson, D. R., Brown, B., Lu, Y., Prasad, N. K., Zhang, B., Mills, G. B., Yarbrough, W. G., Quaranta, V., Seiki, M., & Weaver, A. M. (2012). Network analysis of the focal adhesion to invadopodia transition identifies a PI3K-PKC $\alpha$  invasive signaling axis. *Science Signaling*, 5(241), ra66–ra66.
- Hu, Y., Chan, E., Wang, S. X., & Li, B. (2003). Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Is Required for Osteoblast Differentiation. *Endocrinology*, 144(5), 2068–2074.
- Huber, C., Faqeih, E. A., Bartholdi, D., Bole-Feysot, C., Borochoowitz, Z., Cavalcanti, D. P., Frigo, A., Nitschke, P., Roume, J., Santos, H. G., Shalev, S. A., Superti-Furga, A., Delezoide, A. L., Le Merrer, M., Munnich, A., & Cormier-Daire, V. (2013). Exome sequencing identifies INPPL1 mutations as a cause of opsismodysplasia. *American Journal of Human Genetics*, 92(1), 144–149.
- Huesa, C., Yadav, M. C., Finnäll, M. A. J., Goodyear, S. R., Robins, S. P., Tanner, K. E., Aspdén, R. M., Millán, J. L., & Farquharson, C. (2011). PHOSPHO1 is essential for mechanically competent mineralization and the avoidance of spontaneous fractures. *Bone*, 48(5), 1066–1074.
- Hung, I. H., Yu, K., Lavine, K. J., & Ornitz, D. M. (2007). FGF9 regulates early hypertrophic chondrocyte differentiation and skeletal vascularization in the developing stylopod. *Developmental Biology*, 307(2), 300–313.
- Hunziker, E. B. (1994). Mechanism of longitudinal bone growth and its regulation by growth plate chondrocytes. *Microscopy Research and Technique*, 28(6), 505–519.
- Iida, A., Okamoto, N., Miyake, N., Nishimura, G., Minami, S., Sugimoto, T., Nakashima, M., Tsurusaki, Y., Saitsu, H., Shiina, M., Ogata, K., Watanabe, S., Ohashi, H., Matsumoto, N., & Ikegawa, S. (2013a). Exome sequencing identifies a novel INPPL1 mutation in opsismodysplasia. *Journal of Human Genetics*, 58(6), 391–394.
- Iida, A., Okamoto, N., Miyake, N., Nishimura, G., Minami, S., Sugimoto, T., Nakashima, M., Tsurusaki, Y., Saitsu, H., Shiina, M., Ogata, K., Watanabe, S., Ohashi, H., Matsumoto, N., & Ikegawa, S. (2013b). Exome sequencing identifies a novel INPPL1 mutation in opsismodysplasia. *Journal of Human Genetics*, 58(6), 391–394.
- Ijuin. (2019). Phosphoinositide phosphatases in cancer cell dynamics—Beyond PI3K and PTEN. In *Seminars in Cancer*

- Biology* (Vol. 59, pp. 50–65). Academic Press.
- Ijuin, Yu, Y. E., Mizutani, K., Pao, A., Tateya, S., Tamori, Y., Bradley, A., & Takenawa, T. (2008). Increased Insulin Action in SKIP Heterozygous Knockout Mice. *Molecular and Cellular Biology*, 28(17), 5184–5195.
- Ikegami, D., Akiyama, H., Suzuki, A., Nakamura, T., Nakano, T., Yoshikawa, H., & Tsumaki, N. (2011). Sox9 sustains chondrocyte survival and hypertrophy in part through Pik3ca-Akt pathways. *Development*, 138(8), 1507–1519.
- Ikubo, M., Wada, T., Fukui, K., Ishiki, M., Ishihara, H., Asano, T., Tsuneki, H., & Sasaoka, T. (2009). Impact of Lipid phosphatases ship2 and pten on the time-and akt-isoform-specific amelioration of tNF- $\alpha$ -induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 296(1).
- Irie, T., Aizawa, T., & Kokubun, S. (2005). The role of sex hormones in the kinetics of chondrocytes in the growth plate. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, 87-B(9), 1278–1284.
- Ishida, S., Funakoshi, A., Miyasaka, K., Shimokata, H., Ando, F., & Takiguchi, S. (2006). Association of SH-2 containing inositol 5'-phosphatase 2 gene polymorphisms and hyperglycemia. *Pancreas*, 33(1), 63–67.
- Ishihara, H., Sasaoka, T., Hori, H., Wada, T., Hirai, H., Haruta, T., Langlois, W. J., & Kobayashi, M. (1999). Molecular cloning of rat SH2-containing inositol phosphatase 2 (SHIP2) and its role in the regulation of insulin signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 260(1), 265–272.
- Jacoby, M., Cox, J. J., Gayral, S., Hampshire, D. J., Ayub, M., Blockmans, M., Pernot, E., Kisseleva, M. V., Compère, P., Schiffmann, S. N., Gergely, F., Riley, J. H., Pérez-Morga, D., Woods, C. G., & Schurmans, S. (2009). INPP5E mutations cause primary cilium signaling defects, ciliary instability and ciliopathies in human and mouse. *Nature Genetics*, 41(9), 1027–1031.
- Jänne, P. A., Suchy, S. F., Bernard, D., MacDonald, M., Crawley, J., Grinberg, A., Wynshaw-Boris, A., Westphal, H., & Nussbaum, R. L. (1998). Functional overlap between murine Inpp5b and Ocr1l may explain why deficiency of the murine ortholog for OCRL1 does not cause Lowe syndrome in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 101(10), 2042–2053.
- Juryneć, M. J., & Grunwald, D. J. (2010). SHIP2, a factor associated with diet-induced obesity and insulin sensitivity, attenuates FGF signaling in vivo. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 3(11–12), 733–742.
- Kagawa, S., Sasaoka, T., Yaguchi, S., Ishihara, H., Tsuneki, H., Murakami, S., Fukui, K., Wada, T., Kobayashi, S., Kimura, I., & Kobayashi, M. (2005). Impact of Src Homology 2-Containing Inositol 5'-Phosphatase 2 Gene Polymorphisms Detected in a Japanese Population on Insulin Signaling. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(5), 2911–2919.
- Kaisaki, P. J., Delépine, M., Woon, P. Y., Sebag-Montefiore, L., Wilder, S. P., Menzel, S., Vionnet, N., Marion, E., Riveline, J. P., Charpentier, G., Schurmans, S., Levy, J. C., Lathrop, M., Farrall, M., & Gauguier, D. (2004). Polymorphisms in type II SH2 domain-containing inositol 5-phosphatase (INPPL1, SHIP2) are associated with physiological abnormalities of the metabolic syndrome. *Diabetes*, 53(7), 1900–1904.
- Kalajzic, I., Terzic, J., Rumboldt, Z., Mack, K., Naprta, A., Ledgard, F., Gronowicz, G., Clark, S. H., & Rowe, D. W. (2002). Osteoblastic response to the defective matrix in the osteogenesis imperfecta murine (oim) mouse. *Endocrinology*, 143(5), 1594–1601.
- Kam, T. I., Park, H., Gwon, Y., Song, S., Kim, S. H., Moon, S. W., Jo, D. G., & Jung, Y. K. (2016). FcγRIIb-SHIP2 axis links Aβ to tau pathology by disrupting phosphoinositide metabolism in Alzheimer's disease model. *ELife*, 5(NOVEMBER2016).
- Karaplis, A. C., Luz, A., Glowacki, J., Bronson, R. T., Tybulewicz, V. L. J., Kronenberg, H. M., & Mulligan, R. C. (1994). Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene. *Genes and Development*, 8(3), 277–289.
- Karsenty, G., Kronenberg, H. M., & Settembre, C. (2009). Genetic Control of Bone Formation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 25(1), 629–648.
- Kato, K., Yazawa, T., Taki, K., Mori, K., Wang, S., Nishioka, T., Hamaguchi, T., Itoh, T., Takenawa, T., Kataoka, C., Matsuura,

- Y., Amano, M., Murohara, T., & Kaibuchi, K. (2012). The inositol 5-phosphatase SHIP2 is an effector of RhoA and is involved in cell polarity and migration. *Molecular Biology of the Cell*, 23(13), 2593–2604.
- Kawai, M., & Rosen, C. J. (2012). The Insulin-Like Growth Factor System in Bone. Basic and Clinical Implications. In *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* (Vol. 41, Issue 2, pp. 323–333). NIH Public Access.
- Kirsch, T., Nah, H. D., Shapiro, I. M., & Pacifici, M. (1997). Regulated production of mineralization-competent matrix vesicles in hypertrophic chondrocytes. *Journal of Cell Biology*, 137(5), 1149–1160.
- Kobayashi, T., Soegiarto, D. W., Yang, Y., Lanske, B., Schipani, E., McMahon, A. P., & Kronenberg, H. M. (2005). Indian hedgehog stimulates periarticular chondrocyte differentiation to regulate growth plate length independently of PTHrP. *Journal of Clinical Investigation*, 115(7), 1734–1742.
- Koch, A., Mancini, A., El Bounkari, O., & Tamura, T. (2005). The SH2-domain-containing inositol 5-phosphatase (SHIP)-2 binds to c-Met directly via tyrosine residue 1356 and involves hepatocyte growth factor (HGF)-induced lamellipodium formation, cell scattering and cell spreading. *Oncogene*, 24(21), 3436–3447.
- Kolay, S., Basu, U., & Raghu, P. (2016). Control of diverse subcellular processes by a single multi-functional lipid phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate [PI(4,5)P<sub>2</sub>]. In *Biochemical Journal* (Vol. 473, Issue 12, pp. 1681–1692). Portland Press Ltd.
- Kozhemyakina, E., Lassar, A. B., & Zelzer, E. (2015). A pathway to bone: signaling molecules and transcription factors involved in chondrocyte development and maturation. *Development (Cambridge, England)*, 142(5), 817–831.
- Krause, M., & Gautreau, A. (2014). Steering cell migration: lamellipodium dynamics and the regulation of directional persistence. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15, 577.
- Kronenberg, H. M. (2003). Developmental regulation of the growth plate. In *Nature* (Vol. 423, Issue 6937, pp. 332–336). Nature.
- Kunkel, M. T., Ni, Q., Tsien, R. Y., Zhang, J., & Newton, A. C. (2005). Spatio-temporal dynamics of protein kinase B/Akt signaling revealed by a genetically encoded fluorescent reporter. *Journal of Biological Chemistry*, 280(7), 5581–5587.
- Lam, P. ying, Yoo, S. K., Green, J. M., & Huttenlocher, A. (2012). The SH2-domain-containing inositol 5-phosphatase (SHIP) limits the motility of neutrophils and their recruitment to wounds in zebrafish. *Journal of Cell Science*, 125(21), 4973–4978.
- Landego, I., Jayachandran, N., Wullschleger, S., Zhang, T. T., Gibson, I. W., Miller, A., Alessi, D. R., & Marshall, A. J. (2012). Interaction of TAPP adapter proteins with phosphatidylinositol (3,4)-bisphosphate regulates B-cell activation and autoantibody production. *European Journal of Immunology*, 42(10), 2760–2770.
- Lawrence, M. C., Jivan, A., Shao, C., Duan, L., Goad, D., Zaganjor, E., Osborne, J., McGlynn, K., Stippec, S., Earnest, S., Chen, W., & Cobb, M. H. (2008). The roles of MAPKs in disease. In *Cell Research* (Vol. 18, Issue 4, pp. 436–442).
- Le Coq, Camacho-Artacho, M., Velázquez, J., Santiveri, C. M., Gallego, L. H., Campos-Olivas, R., Dölker, N., & Lietha, D. (2017). Structural basis for interdomain communication in SHIP2 providing high phosphatase activity. *ELife*, 6.
- Lee, H. N., Sim, K. M., Kim, H., Ju, J., Pae, A. N., Park, J. B., Ryu, H., & Seong, J. (2019). Aβ modulates actin cytoskeleton via SHIP2-mediated phosphoinositide metabolism. *Scientific Reports*, 9(1).
- Lee, Nevarez, L., Lachman, R. S., Wilcox, W. R., Krakow, D., & Cohn, D. H. (2015). A second locus for schneckenbecken dysplasia identified by a mutation in the gene encoding inositol polyphosphate phosphatase-like 1 (INPPL1). *American Journal of Medical Genetics Part A*, 167(10), 2470–2473.
- Lefebvre, V., & Dvir-Ginzberg, M. (2017). SOX9 and the many facets of its regulation in the chondrocyte lineage. In *Connective Tissue Research* (Vol. 58, Issue 1, pp. 2–14).
- Legeai-Mallet, L., Benoist-Lassel, C., Munnich, A., & Bonaventure, J. (2004). Overexpression of FGFR3, Stat1, Stat5 and p21Cip1 correlates with phenotypic severity and defective chondrocyte differentiation in FGFR3-related chondrodysplasias. *Bone*, 34(1), 26–36.
- Lemmon, M. A., & Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. In *Cell* (Vol. 141, Issue 7, pp. 1117–1134). NIH Public Access.

- Lewinson, D., & Silbermann, M. (1992). Chondroclasts and endothelial cells collaborate in the process of cartilage resorption. *The Anatomical Record*, 233(4), 504–514.
- Li, C., Chen, L., Iwata, T., Kitagawa, M., Fu, X. Y., & Deng, C. X. (1999). A Lys644Glu substitution in fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) causes dwarfism in mice by activation of STATs and ink4 cell cycle inhibitors. *Human Molecular Genetics*, 8(1), 35–44.
- Li Chew, Lunardi, A., Gulluni, F., Ruan, D. T., Chen, M., Salmena, L., Nishino, M., Papa, A., Ng, C., Fung, J., Clohessy, J. G., Sasaki, J., Sasaki, T., Bronson, R. T., Hirsch, E., & Pandolfi, P. P. (2015). In Vivo Role of INPP4B in Tumor and Metastasis Suppression through Regulation of PI3K-AKT Signaling at Endosomes. *Cancer Discovery*, 5(7), 740–751.
- Li, & Dong, S. (2016). The signaling pathways involved in chondrocyte differentiation and hypertrophic differentiation. *Stem Cells International*, 2016, 1–13.
- Li, Krakow, D., Nickerson, D. A., Bamshad, M. J., Chang, Y., Lachman, R. S., Yilmaz, A., Kayserili, H., & Cohn, D. H. (2014). Opsismodysplasia resulting from an insertion mutation in the SH2 domain, which destabilizes INPPL1. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 164(9), 2407–2411.
- Li, Y., Mangasarian, K., Mansukhani, A., & Basilico, C. (1997). Activation of FGF receptors by mutations in the transmembrane domain. *Oncogene*, 14(12), 1397–1406.
- Libouban, H., Filmon, R., Mauréac, A., Baslé, M. F., & Chappard, D. (2009). Fetuin and osteocalcin interact with calcospherite formation during the calcification process of poly(2-hydroxyethylmethacrylate) in vitro: A Raman microspectroscopic monitoring. *Journal of Raman Spectroscopy*, 40(9), 1234–1239.
- Lim, J. P., Wang, J. T. H., Kerr, M. C., Teasdale, R. D., & Gleeson, P. A. (2008). A role for SNX5 in the regulation of macropinocytosis. *BMC Cell Biology*, 9(1), 58.
- Liu, Angelozzi, M., Haseeb, A., & Lefebvre, V. (2018). SOX9 is dispensable for the initiation of epigenetic remodeling and the activation of marker genes at the onset of chondrogenesis. *Development*, 145(14), dev164459.
- Liu, Gao, F., Wen, L., Ouyang, M., Wang, Y., Wang, Q., Luo, L., & Jian, Z. (2017). Osteocalcin Induces Proliferation via Positive Activation of the PI3K/Akt, P38 MAPK Pathways and Promotes Differentiation Through Activation of the GPRC6A-ERK1/2 Pathway in C2C12 Myoblast Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 43(3), 1100–1112.
- Liu, Lavine, K. J., Hung, I. H., & Ornitz, D. M. (2007). FGF18 is required for early chondrocyte proliferation, hypertrophy and vascular invasion of the growth plate. *Developmental Biology*, 302(1), 80–91.
- Liu, Liu, F., Cao, Y., Xu, H., Wu, Y., Wu, S., Liu, D., Zhao, Y., Songyang, Z., & Ma, W. (2018). Shwachman-Diamond Syndrome Protein SBDS Maintains Human Telomeres by Regulating Telomerase Recruitment. *Cell Reports*, 22(7), 1849–1860.
- Liu, Sasaki, T., Kozieradzki, I., Wakeham, A., Itie, A., Dumont, D. J., & Penninger, J. M. (1999). SHIP is a negative regulator of growth factor receptor-mediated PKB/Akt activation and myeloid cell survival. *Genes and Development*, 13(7), 786–791.
- Liu, Yang, Geng, M., & Huang, M. (2018). Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy. In *Acta Pharmaceutica Sinica B* (Vol. 8, Issue 4, pp. 552–562). Chinese Academy of Medical Sciences.
- Liu, Z., Chen, R., Jiang, Y., Yang, Y., He, L., Luo, C., Dong, J., & Rong, L. (2019). A meta-Analysis of serum osteocalcin level in postmenopausal osteoporotic women compared to controls. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 20(1), 532.
- Luongo, F., Colonna, F., Calapà, F., Vitale, S., Fiori, M. E., & De Maria, R. (2019). Pten tumor-suppressor: The dam of stemness in cancer. In *Cancers* (Vol. 11, Issue 8). MDPI AG.
- M, K. (1996). The control of inositol lipid hydrolysis. *Cancer Surveys*, 27, 199–211.
- Mackie, E. J., Ahmed, Y. A., Tatarczuch, L., Chen, K.-S., & Mirams, M. (2008). Endochondral ossification: How cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(1), 46–62.
- Maeda, Y., Nakamura, E., Nguyen, M. T., Suva, L. J., Swain, F. L., Razzaque, M. S., Mackem, S., & Lanske, B. (2007). Indian Hedgehog produced by postnatal chondrocytes is essential for maintaining a growth plate and trabecular bone.



- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(15), 6382–6387.
- Maes, C., Goossens, S., Bartunkova, S., Drogat, B., Coenegrachts, L., Stockmans, I., Moermans, K., Nyabi, O., Haigh, K., Naessens, M., Haenebalcke, L., Tuckermann, J. P., Tjwa, M., Carmeliet, P., Mandic, V., David, J. P., Behrens, A., Nagy, A., Carmeliet, G., & Haigh, J. J. (2010). Increased skeletal VEGF enhances B-catenin activity and results in excessively ossified bones. *EMBO Journal*, 29(2), 424–441.
- Maes, C., Kobayashi, T., Selig, M. K., Torrekens, S., Roth, S. I., Mackem, S., Carmeliet, G., & Kronenberg, H. M. (2010). Osteoblast Precursors, but Not Mature Osteoblasts, Move into Developing and Fractured Bones along with Invading Blood Vessels. *Developmental Cell*, 19(2), 329–344.
- Maes, C., & Kronenberg, H. M. (2012). Pediatric Bone. In *Pediatric Bone*. Elsevier.
- Maes, C., & Kronenberg, H. M. (2016). Bone Development and Remodeling. In *Endocrinology: Adult and Pediatric* (Seventh Ed). Elsevier.
- Magne, D., Bluteau, G., Faucheux, C., Palmer, G., Vignes-Colombeix, C., Pilet, P., Rouillon, T., Caverzasio, J., Weiss, P., Daculsi, G., & Guicheux, J. (2003). Phosphate is a specific signal for ATDC5 chondrocyte maturation and apoptosis-associated mineralization: Possible implication of apoptosis in the regulation of endochondral ossification. *Journal of Bone and Mineral Research*, 18(8), 1430–1442.
- Mahamid, J., Addadi, L., & Weiner, S. (2011). Crystallization pathways in bone. *Cells Tissues Organs*, 194(2–4), 92–97.
- Malek, M., Kielkowska, A., Chessa, T., Anderson, K. E., Barneda, D., Pir, P., Nakanishi, H., Eguchi, S., Koizumi, A., Sasaki, J., Juvin, V., Kiselev, V. Y., Niewczas, I., Gray, A., Valayer, A., Spensberger, D., Imbert, M., Felisbino, S., Habuchi, T., ... Stephens, L. R. (2017). PTEN Regulates PI(3,4)P2 Signaling Downstream of Class I PI3K. *Molecular Cell*, 68(3), 566–580.e10.
- Mani, M., Lee, S. Y., Lucast, L., Cremona, O., Di Paolo, G., De Camilli, P., & Ryan, T. A. (2007). The Dual Phosphatase Activity of Synaptojanin1 Is Required for Both Efficient Synaptic Vesicle Endocytosis and Reavailability at Nerve Terminals. *Neuron*, 56(6), 1004–1018.
- Manji, S. S. M., Williams, L. H., Miller, K. A., Ooms, L. M., Bahlo, M., Mitchell, C. A., & Dahl, H. H. M. (2011). A mutation in synaptojanin 2 causes progressive hearing loss in the ENU-mutagenised mouse strain mozart. *PLoS ONE*, 6(3).
- Manning, B. D., & Toker, A. (2017). AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. In *Cell* (Vol. 169, Issue 3, pp. 381–405). Cell Press.
- Marat, A. L., Wallroth, A., Lo, W. T., Müller, R., Norata, G. D., Falasca, M., Schultz, C., & Haucke, V. (2017). mTORC1 activity repression by late endosomal phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate. *Science*, 356(6341), 968–972.
- Marie, P. (2001). Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste. In *Medecine/Sciences* (Vol. 17, Issue 12, pp. 1252–1259). Elsevier Masson SAS.
- Marion, E., Kaisaki, P. J., Pouillon, V., Gueydan, C., Levy, J. C., Bodson, A., Krzentowski, G., Daubresse, J. C., Mockel, J., Behrends, J., Servais, G., Szpirer, C., Kruys, V., Gauguier, D., & Schurmans, S. (2002). The gene INPPL1, encoding the lipid phosphatase SHIP2, is a candidate for type 2 diabetes in rat and man. *Diabetes*, 51(7), 2012–2017.
- Maroteaux, Stanescu, V., & Stanescu, R. (1982). Four recently described osteochondrodysplasias. *Progress in Clinical and Biological Research*, 104, 345–350.
- Maroteaux, Stanescu, V., Stanescu, R., Le Marec, B., Moraine, C., & Lejarraaga, H. (1984). Opsismodysplasia: A new type of chondrodysplasia with predominant involvement of the bones of the hand and the vertebrae. *American Journal of Medical Genetics*, 19(1), 171–182.
- Mayer, I. A., & Arteaga, C. L. (2016). The PI3K/AKT Pathway as a Target for Cancer Treatment. *Annual Review of Medicine*, 67(1), 11–28.
- McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Wong, E. W. T., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D. M., Milella, M., Tafuri, A., Stivala, F., Libra, M., Basecke, J., Evangelisti, C., Martelli, A. M., & Franklin, R. A. (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1773, Issue 8, pp. 1263–1284). NIH Public Access.

- McKinley, Liu, H., McDonald, W. H., Luo, W., Zhao, P., Coffey, R. J., Hanks, S. K., & Manning, H. C. (2013). Global Phosphotyrosine Proteomics Identifies PKC $\delta$  as a Marker of Responsiveness to Src Inhibition in Colorectal Cancer. *PLoS ONE*, 8(11), e80207.
- McPherson, P. S., Garcia, E. P., Slepnev, V. I., David, C., Zhang, X., Grabs, D., Sossin, W. S., Bauerfeind, R., Nemoto, Y., & De Camilli, P. (1996). A presynaptic inositol-5-phosphatase. *Nature*, 379(6563), 353–357.
- Mégarbané, A., Mehawej, C., Zahr, A. El, Haddad, S., & Cormier-Daire, V. (2014). A second family with autosomal recessive spondylometaphyseal dysplasia and early death. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 164(4), 1010–1014.
- Mehawej, C., Delahodde, A., Legeai-Mallet, L., Delague, V., Kaci, N., Desvignes, J.-P., Kibar, Z., Capo-Chichi, J.-M., Chouery, E., Munnich, A., Cormier-Daire, V., & Mégarbané, A. (2014). The Impairment of MAGMAS Function in Human Is Responsible for a Severe Skeletal Dysplasia. *PLoS Genetics*, 10(5), e1004311.
- Meldrum, E., Parker, P. J., & Carozzi, A. (1991). The PtdIns-PLC superfamily and signal transduction. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1092(1), 49–71.
- Mellman, D. L., Gonzales, M. L., Song, C., Barlow, C. A., Wang, P., Kendzierski, C., & Anderson, R. A. (2008). A PtdIns4,5P2-regulated nuclear poly(A) polymerase controls expression of select mRNAs. *Nature*, 451(7181), 1013–1017.
- Mendoza, M. C., Er, E. E., & Blenis, J. (2011). The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: Cross-talk and compensation. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 36, Issue 6, pp. 320–328).
- Mercurio, F. A., Di Natale, C., Pirone, L., Iannitti, R., Marasco, D., Pedone, E. M., Palumbo, R., & Leone, M. (2017). The Sam-Sam interaction between Ship2 and the EphA2 receptor: Design and analysis of peptide inhibitors. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11.
- Mesmin, B., Bigay, J., Polidori, J., Jamecna, D., Lacas-Gervais, S., & Antonny, B. (2017). Sterol transfer, PI 4P consumption, and control of membrane lipid order by endogenous OSBP. *The EMBO Journal*, 36(21), 3156–3174.
- Minina, E., Kreschel, C., Naski, M. C., Ornitz, D. M., & Vortkamp, A. (2002). Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. *Developmental Cell*, 3(3), 439–449.
- Miranda, A. M., Herman, M., Cheng, R., Nahmani, E., Barrett, G., Micevska, E., Fontaine, G., Potier, M. C., Head, E., Schmitt, F. A., Lott, I. T., Jiménez-Velázquez, I. Z., Antonarakis, S. E., Di Paolo, G., Lee, J. H., Hussaini, S. A., & Marquer, C. (2018). Excess Synaptojanin 1 Contributes to Place Cell Dysfunction and Memory Deficits in the Aging Hippocampus in Three Types of Alzheimer's Disease. *Cell Reports*, 23(10), 2967–2975.
- Mizuno-Yamasaki, E., Medkova, M., Coleman, J., & Novick, P. (2010). Phosphatidylinositol 4-phosphate controls both membrane recruitment and a regulatory switch of the Rab GEF Sec2p. *Developmental Cell*, 18(5), 828–840.
- Mohan, S., & Kesavan, C. (2012). Role of insulin-like growth factor-1 in the regulation of skeletal growth. *Current Osteoporosis Reports*, 10(2), 178–186.
- Morrison, D. K. (2012). MAP kinase pathways. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(11).
- Mortier, G. R., Cohn, D. H., Cormier-Daire, V., Hall, C., Krakow, D., Mundlos, S., Nishimura, G., Robertson, S., Sangiorgi, L., Savarirayan, R., Silience, D., Superti-Furga, A., Unger, S., & Warman, M. L. (2019). Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2019 revision. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 179(12), 2393–2419.
- Muraille, E., Dassel, D., Vanderwinden, J. M., Cremer, H., Rogister, B., Erneux, C., & Schiffmann, S. N. (2001). The SH2 domain-containing 5-phosphatase SHIP2 is expressed in the germinal layers of embryo and adult mouse brain: Increased expression in N-CAM-deficient mice. *Neuroscience*, 105(4), 1019–1030.
- Murakami, & Noda, M. (2000). Expression of Indian hedgehog during fracture healing in adult rat femora. *Calcified Tissue International*, 66(4), 272–276.
- Murakami, S., Balmes, G., McKinney, S., Zhang, Z., Givol, D., & De Crombrughe, B. (2004). Constitutive activation of MEK1 in chondrocytes causes Stat1-independent achondroplasia-like dwarfism and rescues the Fgfr3-deficient mouse phenotype. *Genes and Development*, 18(3), 290–305.
- Murakami, S., Kan, M., McKeehan, W. L., & De Crombrughe, B. (2000). Up-regulation of the chondrogenic Sox9 gene by

- fibroblast growth factors is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(3), 1113–1118.
- Murshed, M., Schinke, T., McKee, M. D., & Karsenty, G. (2004). Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins. *Journal of Cell Biology*, 165(5), 625–630.
- Muta, Y., Matsuda, M., & Imajo, M. (2019). Divergent dynamics and functions of ERK map kinase signaling in development, homeostasis and cancer: Lessons from fluorescent bioimaging. *Cancers*, 11(4).
- Nakamura, T., Gulick, J., Pratt, R., & Robbins, J. (2009). Noonan syndrome is associated with enhanced pERK activity, the repression of which can prevent craniofacial malformations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(36), 15436–15441.
- Nakatsu, F., Perera, R. M., Lucast, L., Zoncu, R., Domin, J., Gertler, F. B., Toomre, D., & De Camilli, P. (2010a). The inositol 5-phosphatase SHIP2 regulates endocytic clathrin-coated pit dynamics. *Journal of Cell Biology*, 190(3), 307–315.
- Nakatsu, F., Perera, R. M., Lucast, L., Zoncu, R., Domin, J., Gertler, F. B., Toomre, D., & De Camilli, P. (2010b). The inositol 5-phosphatase SHIP2 regulates endocytic clathrin-coated pit dynamics. *Journal of Cell Biology*, 190(3), 307–315.
- Nández, R., Balkin, D. M., Messa, M., Liang, L., Paradise, S., Czapla, H., Hein, M. Y., Duncan, J. S., Mann, M., & De Camilli, P. (2014). A role of OCRL in clathrin-coated pit dynamics and uncoating revealed by studies of Lowe syndrome cells. *ELife*, 3, 1–27.
- Newton, Li, L., Zhou, B., Schweingruber, C., Hovorakova, M., Xie, M., Sun, X., Sandhow, L., Artemov, A. V., Ivashkin, E., Suter, S., Dyachuk, V., El Shahawy, M., Gritli-Linde, A., Boudierlique, T., Petersen, J., Mollbrink, A., Lundeberg, J., Enikolopov, G., ... Chagin, A. S. (2019). A radical switch in clonality reveals a stem cell niche in the epiphyseal growth plate. In *Nature* (Vol. 567, Issue 7747, pp. 234–238). Nature Publishing Group.
- Nikel, O., Laurencin, D., McCallum, S. A., Gundberg, C. M., & Vashishth, D. (2013). NMR investigation of the role of osteocalcin and osteopontin at the organic-inorganic interface in bone. *Langmuir*, 29(45), 13873–13882.
- Nikel, O., Poundarik, A. A., Bailey, S., & Vashishth, D. (2018). Structural role of osteocalcin and osteopontin in energy dissipation in bone. *Journal of Biomechanics*, 80, 45–52.
- Nikkels, P. G., Stigter, R. H., Knol, I. E., & Van Der Harten, H. J. (2001). Schneckbecken dysplasia, radiology, and histology. *Pediatric Radiology*, 31(1), 27–30.
- Nishimura, G., Nakashima, E., Hirose, Y., Cole, T., Cox, P., Cohn, D. H., Rimoin, D. L., Lachman, R. S., Miyamoto, Y., Kerr, B., Unger, S., Ohashi, H., Superti-Furga, A., & Ikegawa, S. (2007). The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome gene mutations cause a neonatal form of spondylometaphysial dysplasia (SMD) resembling SMD Sedaghatian type. In *Journal of medical genetics* (Vol. 44, Issue 4, p. e73). BMJ Publishing Group.
- O'Donnell, J. S., Massi, D., Teng, M. W. L., & Mandala, M. (2018). PI3K-AKT-mTOR inhibition in cancer immunotherapy, redux. In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 48, pp. 91–103). Academic Press.
- Oh, J. H., Park, S. Y., de Crombrughe, B., & Kim, J. E. (2012). Chondrocyte-specific ablation of Osterix leads to impaired endochondral ossification. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 418(4), 634–640.
- Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnäd, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., & Mann, M. (2006). Global, In Vivo, and Site-Specific Phosphorylation Dynamics in Signaling Networks. *Cell*, 127(3), 635–648.
- Ooms, L. M., Binge, L. C., Davies, E. M., Rahman, P., Conway, J. R. W., Gurung, R., Ferguson, D. T., Papa, A., Fedele, C. G., Vieusseux, J. L., Chai, R. C., Koentgen, F., Price, J. T., Tiganis, T., Timpson, P., McLean, C. A., & Mitchell, C. A. (2015). The Inositol Polyphosphate 5-Phosphatase PIPP Regulates AKT1-Dependent Breast Cancer Growth and Metastasis. *Cancer Cell*, 28(2), 155–169.
- Ornitz, D. M., & Legeai-Mallet, L. (2017). Achondroplasia: Development, pathogenesis, and therapy. In *Developmental Dynamics* (Vol. 246, Issue 4, pp. 291–309).
- Ornitz, D. M., & Marie, P. J. (2015). Fibroblast growth factor signaling in skeletal development and disease. In *Genes and Development* (Vol. 29, Issue 14, pp. 1463–1486). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Osborn, D. P. S., Pond, H. L., Mazaheri, N., DeJardin, J., Munn, C. J., Mushref, K., Cauley, E. S., Moroni, I., Pasanisi, M. B.,

- Sellers, E. A., Hill, R. S., Partlow, J. N., Willaert, R. K., Bharj, J., Malamiri, R. A., Galehdari, H., Shariati, G., Maroofian, R., Mora, M., ... Manzini, M. C. (2017). Mutations in INPP5K Cause a Form of Congenital Muscular Dystrophy Overlapping Marinesco-Sjögren Syndrome and Dystroglycanopathy. *American Journal of Human Genetics*, 100(3), 537–545.
- Padmanabhan, S., Mukhopadhyay, A., Narasimhan, S. D., Tesz, G., Czech, M. P., & Tissenbaum, H. A. (2009). A PP2A Regulatory Subunit Regulates *C. elegans* Insulin/IGF-1 Signaling by Modulating AKT-1 Phosphorylation. *Cell*, 136(5), 939–951.
- Pauli, R. M. (2019). Achondroplasia: A comprehensive clinical review. In *Orphanet Journal of Rare Diseases* (Vol. 14, Issue 1, pp. 1–49). BioMed Central Ltd.
- Payne, R. B., & Walker, B. E. (1979). Serum-Calcium. In *The Lancet* (Vol. 313, Issue 8128, p. 1248). Butterworths.
- Peng, X. ding, Xu, P. Z., Chen, M. L., Hahn-Windgassen, A., Skeen, J., Jacobs, J., Sundararajan, D., Chen, W. S., Crawford, S. E., Coleman, K. G., & Hay, N. (2003). Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes and Development*, 17(11), 1352–1365.
- Percival, C. J., & Richtsmeier, J. T. (2013). Angiogenesis and intramembranous osteogenesis. In *Developmental Dynamics* (Vol. 242, Issue 8, pp. 909–922). NIH Public Access.
- Pernot, E., Terryn, S., Cheong, S. C., Markadieu, N., Janas, S., Blockmans, M., Jacoby, M., Pouillon, V., Gayral, S., Rossier, B. C., Beauwens, R., Erneux, C., Devuyst, O., & Schurmans, S. (2011). The inositol Inpp5k 5-phosphatase affects osmoregulation through the vasopressin-aquaporin 2 pathway in the collecting system. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 462(6), 871–883.
- Pesesse, X., Deleu, S., De Smedt, F., Drayer, L., & Erneux, C. (1997). Identification of a Second SH2-Domain-Containing Protein Closely Related to the Phosphatidylinositol Polyphosphate 5-Phosphatase SHIP. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 239(9), 697–700.
- Pesesse, X., Dewaste, V., De Smedt, F., Laffargue, M., Giuriato, S., Moreau, C., Payrastra, B., & Erneux, C. (2001). The Src Homology 2 Domain Containing Inositol 5-Phosphatase SHIP2 is Recruited to the Epidermal Growth Factor (EGF) Receptor and Dephosphorylates Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate in EGF-stimulated COS-7 Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276(30), 28348–28355.
- Pesesse, X., Moreau, C., Drayer, A. L., Woscholski, R., Parker, P., & Erneux, C. (1998). The SH2 domain containing inositol 5-phosphatase SHIP2 displays phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate 5-phosphatase activity. *FEBS Letters*, 437(3), 301–303.
- Peterson, H. A. (2007). Epiphyseal growth plate fractures. In *Epiphyseal Growth Plate Fractures*. Springer Berlin Heidelberg.
- Petrenko, A. G., Zozulya, S. A., Deyev, I. E., & Eladari, D. (2013). Insulin receptor-related receptor as an extracellular pH sensor involved in the regulation of acid-base balance. In *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* (Vol. 1834, Issue 10, pp. 2170–2175).
- Phan, T. K., Williams, S. A., Bindra, G. K., Lay, F. T., Poon, I. K. H., & Hulett, M. D. (2019). Phosphoinositides: multipurpose cellular lipids with emerging roles in cell death. In *Cell Death and Differentiation* (Vol. 26, Issue 5, pp. 781–793). Nature Publishing Group.
- Posor, Y., Eichhorn-Gruenig, M., Puchkov, D., Schöneberg, J., Ullrich, A., Lampe, A., Müller, R., Zarbakhsh, S., Gulluni, F., Hirsch, E., Krauss, M., Schultz, C., Schmoranz, J., Noé, F., & Haucke, V. (2013). Spatiotemporal control of endocytosis by phosphatidylinositol-3,4- bisphosphate. *Nature*, 499(7457), 233–237.
- Posor, Y., Eichhorn-Grünig, M., & Haucke, V. (2015). Phosphoinositides in endocytosis. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* (Vol. 1851, Issue 6, pp. 794–804). Elsevier B.V.
- Prasad. (2009). SHIP2 phosphoinositol phosphatase positively regulates EGFR-Akt pathway, CXCR4 expression, and cell migration in MDA-MB-231 breast cancer cells. *International Journal of Oncology*, 34(1), 97–105.
- Prasad, Tandon, M., Badve, S., Snyder, P. W., & Nakshatri, H. (2008). Phosphoinositol phosphatase SHIP2 promotes cancer development and metastasis coupled with alterations in EGF receptor turnover. *Carcinogenesis*, 29(1), 25–34.

- Prasad, Topping, R. S., & Decker, S. J. (2001). SH2-Containing Inositol 5'-Phosphatase SHIP2 Associates with the p130Cas Adapter Protein and Regulates Cellular Adhesion and Spreading. *Molecular and Cellular Biology*, 21(4), 1416–1428.
- Prasad, Topping, R. S., & Decker, S. J. (2002). Src family tyrosine kinases regulate adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of 5'-inositol phosphatase SHIP2 during cell attachment and spreading on collagen I. *Journal of Cell Science*, 115(19), 3807–3815.
- Prein, C., Warmbold, N., Farkas, Z., Schieker, M., Aszodi, A., & Clausen-Schaumann, H. (2016). Structural and mechanical properties of the proliferative zone of the developing murine growth plate cartilage assessed by atomic force microscopy. *Matrix Biology*, 50, 1–15.
- Price, P. A., Otsuka, A. S., Poser, J. W., Kristaponis, J., & Raman, N. (1976). Characterization of a  $\gamma$  carboxyglutamic acid containing protein from bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(5), 1447–1451.
- Price, P. A., Poser, J. W., & Raman, N. (1976). Primary structure of the  $\gamma$  carboxyglutamic acid containing protein from bovine bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(10), 3374–3375.
- Provot, S., & Schipani, E. (2005). Molecular mechanisms of endochondral bone development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 328(3), 658–665.
- Raaijmakers, J. H., Deneubourg, L., Rehmann, H., de Koning, J., Zhang, Z., Krugmann, S., Erneux, C., & Bos, J. L. (2007). The PI3K effector Arap3 interacts with the PI(3,4,5)P3 phosphatase SHIP2 in a SAM domain-dependent manner. *Cellular Signalling*, 19(6), 1249–1257.
- Raggatt, L. J., & Partridge, N. C. (2010). Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 285, Issue 33, pp. 25103–25108). American Society for Biochemistry and Molecular Biology.
- Ramasamy, S. K., Kusumbe, A. P., Schiller, M., Zeuschner, D., Bixel, M. G., Milia, C., Gamrekelashvili, J., Limbourg, A., Medvinsky, A., Santoro, M. M., Limbourg, F. P., & Adams, R. H. (2016). Blood flow controls bone vascular function and osteogenesis. *Nature Communications*, 7(1), 1–13.
- Ramos, Elong Edimo, W., & Erneux, C. (2018). Phosphoinositide 5-phosphatase activities control cell motility in glioblastoma: Two phosphoinositides PI(4,5)P2 and PI(3,4)P2 are involved. In *Advances in Biological Regulation* (Vol. 67, pp. 40–48). Elsevier Ltd.
- Ramos, Ghosh, S., Dedobbeleer, M., Robe, P. A., Rogister, B., & Erneux, C. (2019). Lipid phosphatases SKIP and SHIP2 regulate fibronectin-dependent cell migration in glioblastoma. *The FEBS Journal*, 286(6), 1120–1135.
- Ramos, Ghosh, S., & Erneux, C. (2019). The impact of phosphoinositide 5-phosphatases on phosphoinositides in cell function and human disease. In *Journal of Lipid Research* (Vol. 60, Issue 2, pp. 276–286). American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc.
- Ramos, González, J. P., Cortabarría, C., Domenech, E., Pérez-González, J., & Bueno, M. (2006). A further case of opsismodysplasia with hydrocephalus. *European Journal of Medical Genetics*, 49(1), 93–100.
- Rauci, A., Laplantine, E., Mansukhani, A., & Basilico, C. (2004). Activation of the ERK1/2 and p38 Mitogen-activated Protein Kinase Pathways Mediates Fibroblast Growth Factor-induced Growth Arrest of Chondrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 279(3), 1747–1756.
- Readinger, J. A., Mueller, K. L., Venegas, A. M., Horai, R., & Schwartzberg, P. L. (2009). Tec kinases regulate T-lymphocyte development and function: New insights into the roles of Itk and Rlk/Txk. *Immunological Reviews*, 228(1), 93–114.
- Retting, K. N., Song, B., Yoon, B. S., & Lyons, K. M. (2009). BMP canonical Smad signaling through Smad1 and Smad5 is required for endochondral bone formation. *Development*, 136(7), 1093–1104.
- Ritter, N. M., Farach-Carson, M. C., & Butler, W. T. (1992). Evidence for the formation of a complex between osteopontin and osteocalcin. *Journal of Bone and Mineral Research*, 7(8), 877–885.
- Rosen, C. J., & Motyl, K. J. (2010). No Bones About It: Insulin Modulates Skeletal Remodeling. In *Cell* (Vol. 142, Issue 2, pp. 198–200). Elsevier.
- Roskoski, R. (2019). Targeting ERK1/2 protein-serine/threonine kinases in human cancers. In *Pharmacological Research* (Vol.

- 142, pp. 151–168). Academic Press.
- Rossi, M., Battafarano, G., Pepe, J., Minisola, S., & Del Fattore, A. (2019). The endocrine function of osteocalcin regulated by bone resorption: A lesson from reduced and increased bone mass diseases. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 18). MDPI AG.
- Saarikangas, J., Zhao, H., & Lappalainen, P. (2010). Regulation of the actin cytoskeleton-plasma membrane interplay by phosphoinositides. In *Physiological Reviews* (Vol. 90, Issue 1, pp. 259–289). American Physiological Society Bethesda, MD.
- Sabbagh, Y., Carpenter, T. O., & Demay, M. B. (2005). Hypophosphatemia leads to rickets by impairing caspase-mediated apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(27), 9637–9642.
- Saito, T., Guan, F., Papolos, D. F., Lau, S., Klein, M., Fann, C. S. J., & Lachman, H. M. (2001). Mutation analysis of SYNJ1: A possible candidate gene for chromosome 21q22-linked bipolar disorder. *Molecular Psychiatry*, 6(4), 387–395.
- Santos, H. G., & Saraiva, J. M. (1995). Opsismodysplasia: another case and literature review. *Clinical Dysmorphology*, 4(3), 222–226.
- Sasaki, T., Kim, T.-W., Debari, K., & Nagamine, H. (1996). Cartilage-Bone Replacement in Endochondral Ossification of Mandibular Condylar Heads in Young Beagle Dogs. *Journal of Electron Microscopy*, 45(3), 213–222.
- Sasaoka, T., Kikuchi, K., Wada, T., Sato, A., Hori, H., Murakami, S., Fukui, K., Ishihara, H., Aota, R., Kimura, I., & Kobayashi, M. (2003). Dual role of Src homology domain 2-containing inositol phosphatase 2 in the regulation of platelet-derived growth factor and insulin-like growth factor I signaling in rat vascular smooth muscle cells. *Endocrinology*, 144(9), 4204–4214.
- Savostin-Asling, I., & Asling, C. W. (1973). Resorption of calcified cartilage as seen in Meckel's cartilage of rats. *The Anatomical Record*, 176(3), 345–359.
- Scharstuhl, A., Vitters, E. L., Van Der Kraan, P. M., & Van Den Berg, W. B. (2003). Reduction of Osteophyte Formation and Synovial Thickening by Adenoviral Overexpression of Transforming Growth Factor  $\beta$ /Bone Morphogenetic Protein Inhibitors during Experimental Osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 48(12), 3442–3451.
- Schmid, A. C., Wise, H. M., Mitchell, C. A., Nussbaum, R., & Woscholski, R. (2004). Type II phosphoinositide 5-phosphatases have unique sensitivities towards fatty acid composition and head group phosphorylation. *FEBS Letters*, 576(1–2), 9–13.
- Schurmans, S., Carrió, R., Behrends, J., Pouillon, V., Merino, J., & Clément, S. (1999). The mouse SHIP2 (Inpp11) gene: complementary DNA, genomic structure, promoter analysis, and gene expression in the embryo and adult mouse. *Genomics*, 62(2), 260–271.
- Segev, O., Chumakov, I., Nevo, Z., Givol, D., Madar-Shapiro, L., Sheinin, Y., Weinreb, M., & Yayon, A. (2000). Restrained chondrocyte proliferation and maturation with abnormal growth plate vascularization and ossification in human FGFR-3G380R transgenic mice. *Human Molecular Genetics*, 9(2), 249–258.
- Shah, & Hunter, T. (2006). Turnover of the Active Fraction of IRS1 Involves Raptor-mTOR- and S6K1-Dependent Serine Phosphorylation in Cell Culture Models of Tuberous Sclerosis. *Molecular and Cellular Biology*, 26(17), 6425–6434.
- Shah, Z. H., Jones, D. R., Sommer, L., Foulger, R., Bultsma, Y., D'Santos, C., & Divecha, N. (2013). Nuclear phosphoinositides and their impact on nuclear functions. *FEBS Journal*, 280(24), 6295–6310.
- Shapiro, I. M., Landis, W. J., & Risbud, M. V. (2015). Matrix vesicles: Are they anchored exosomes? In *Bone* (Vol. 79, pp. 29–36). Elsevier Inc.
- Sharma, Eddy, R., Entenberg, D., Kai, M., Gertler, F. B., & Condeelis, J. (2013). Tks5 and SHIP2 regulate invadopodium maturation, but not initiation, in breast carcinoma cells. *Current Biology : CB*, 23(21), 2079–2089.
- Sharma, Mathre, S., Ramya, V., Shinde, D., & Raghu, P. (2019). Phosphatidylinositol 5 Phosphate 4-Kinase Regulates Plasma-Membrane PIP3 Turnover and Insulin Signaling. *Cell Reports*, 27(7), 1979-1990.e7.
- Sharma, Son, H.-S., Ugi, S., Ricketts, W., & Olefsky, J. M. (2005). Mechanism of SHIP-Mediated Inhibition of Insulin- and

- Platelet-Derived Growth Factor-Stimulated Mitogen-Activated Protein Kinase Activity in 3T3-L1 Adipocytes. *Molecular Endocrinology*, 19(2), 421–430.
- Shiang, R., Thompson, L. M., Zhu, Y. Z., Church, D. M., Fielder, T. J., Bocian, M., Winokur, S. T., & Wasmuth, J. J. (1994). Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. *Cell*, 78(2), 335–342.
- Shirley, E. D., & Ain, M. C. (2013). Achondroplasia. In *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition* (pp. 4–6). Elsevier Inc.
- Simanshu, D. K., Nissley, D. V., & McCormick, F. (2017). RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. In *Cell* (Vol. 170, Issue 1, pp. 17–33). Cell Press.
- Sims, N. A., & Vrahnas, C. (2014). Regulation of cortical and trabecular bone mass by communication between osteoblasts, osteocytes and osteoclasts. In *Archives of Biochemistry and Biophysics* (Vol. 561, pp. 22–28). Academic Press Inc.
- Sinha, D., Joshi, N., Chittoor, B., Samji, P., & D'Silva, P. (2010). Role of Magmas in protein transport and human mitochondria biogenesis. *Human Molecular Genetics*, 19(7), 1248–1262.
- Sleeman, M. W., Wortley, K. E., Lai, K.-M. V., Gowen, L. C., Kintner, J., Kline, W. O., Garcia, K., Stitt, T. N., Yancopoulos, G. D., Wiegand, S. J., & Glass, D. J. (2005). Absence of the lipid phosphatase SHIP2 confers resistance to dietary obesity. *Nature Medicine*, 11(2), 199–205.
- Smith, Boyd, J., Frank, G. R., Takahashi, H., Cohen, R. M., Specker, B., Williams, T. C., Lubahn, D. B., & Korach, K. S. (1994). Estrogen Resistance Caused by a Mutation in the Estrogen-Receptor Gene in a Man. *New England Journal of Medicine*, 331(16), 1056–1061.
- Smith, Mears, A. J., Bunker, R., Ahmed, A., MacKenzie, M., Schwartzentruber, J. A., Beaulieu, C. L., Ferretti, E., Majewski, J., Bulman, D. E., Celik, F. C., Boycott, K. M., & Graham, G. E. (2014). Mutations in the enzyme glutathione peroxidase 4 cause Sedaghatian-type spondylometaphyseal dysplasia. *Journal of Medical Genetics*, 51(7), 470–474.
- Smits, P., Bolton, A. D., Funari, V., Hong, M., Boyden, E. D., Lu, L., Manning, D. K., Dwyer, N. D., Moran, J. L., Prysak, M., Merriman, B., Nelson, S. F., Bonafé, L., Superti-Furga, A., Ikegawa, S., Krakow, D., Cohn, D. H., Kirchhausen, T., Warman, M. L., & Beier, D. R. (2010). Lethal Skeletal Dysplasia in Mice and Humans Lacking the Golgin GMAP-210. *New England Journal of Medicine*, 362(3), 206–216.
- So, E. Y., Sun, C., Wu, K. Q., Driesman, A., Leggett, S., Isaac, M., Spangler, T., Dubielecka-Szczerba, P. M., Reginato, A. M., & Liang, O. D. (2020). Lipid phosphatase SHIP-1 regulates chondrocyte hypertrophy and skeletal development. *Journal of Cellular Physiology*, 235(2), 1425–1437.
- Soeda, Y., Tsuneki, H., Muranaka, H., Mori, N., Hosoh, S., Ichihara, Y., Kagawa, S., Wang, X., Toyooka, N., Takamura, Y., Uwano, T., Nishijo, H., Wada, T., & Sasaoka, T. (2010). The Inositol Phosphatase SHIP2 Negatively Regulates Insulin/IGF-I Actions Implicated in Neuroprotection and Memory Function in Mouse Brain. *Molecular Endocrinology*, 24(10), 1965–1977.
- Sohn, M., Korzeniowski, M., Zewe, J. P., Wills, R. C., Hammond, G. R. V., Humpolickova, J., Vrzal, L., Chalupska, D., Veverka, V., Fairn, G. D., Boura, E., & Balla, T. (2018). PI(4,5)P2 controls plasma membrane PI4P and PS levels via ORP5/8 recruitment to ER-PM contact sites. *Journal of Cell Biology*, 217(5), 1797–1813.
- St-Jacques, B., Hammerschmidt, M., & McMahon, A. P. (1999). Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes and Development*, 13(16), 2072–2086.
- Staiano, L., De Leo, M. G., Persico, M., & De Matteis, M. A. (2014). Mendelian disorders of PI metabolizing enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(6), 867–881.
- Stanton, L.-A., Sabari, S., Sampaio, A. V., Underhill, T. M., & Beier, F. (2004). p38 MAP kinase signalling is required for hypertrophic chondrocyte differentiation. *The Biochemical Journal*, 378(Pt 1), 53–62.
- Steen, H., Kuster, B., Fernandez, M., Pandey, A., & Mann, M. (2002). Tyrosine phosphorylation mapping of the epidermal growth factor receptor signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 277(2), 1031–1039.
- Streeten, E. A., & Brandi, M. L. (1990). Biology of bone endothelial cells. In *Bone and Mineral* (Vol. 10, Issue 2, pp. 85–94).



## Bone Miner.

- Su, Du, X. L., & Chen, L. (2008). FGF signaling: Its role in bone development and human skeleton diseases. In *Frontiers in Bioscience* (Vol. 13, Issue 8, pp. 2842–2865).
- Su, K.-J., & Yu, Y.-L. (2019). Downregulation of SHIP2 by Hepatitis B Virus X Promotes the Metastasis and Chemoresistance of Hepatocellular Carcinoma through SKP2. *Cancers*, 11(8), 1065.
- Su, Sun, Q., Li, C., Lu, X., Qi, H., Chen, S., Yang, J., Du, X., Zhao, L., He, Q., Jin, M., Shen, Y., Chen, D., & Chen, L. (2010). Gain-of-function mutation in FGFR3 in mice leads to decreased bone mass by affecting both osteoblastogenesis and osteoclastogenesis. *Human Molecular Genetics*, 19(7), 1199–1210.
- Sugimoto, Y., Takimoto, A., Akiyama, H., Kist, R., Scherer, G., Nakamura, T., Hiraki, Y., & Shukunami, C. (2013). Scx+/Sox9+ progenitors contribute to the establishment of the junction between cartilage and tendon/ligament. *Development*, 140(11), 2280–2288.
- Takarada, T., Hinoi, E., Nakazato, R., Ochi, H., Xu, C., Tsuchikane, A., Takeda, S., Karsenty, G., Abe, T., Kiyonari, H., & Yoneda, Y. (2013). An analysis of skeletal development in osteoblast-specific and chondrocyte-specific runt-related transcription factor-2 (Runx2) knockout mice. *Journal of Bone and Mineral Research*, 28(10), 2064–2069.
- Takeshita, S., Namba, N., Zhao, J. J., Jiang, Y., Genant, H. K., Silva, M. J., Brodt, M. D., Helgason, C. D., Kalesnikoff, J., Rauh, M. J., Humphries, R. K., Krystal, G., Teitelbaum, S. L., & Ross, F. P. (2002). SHIP-deficient mice are severely osteoporotic due to increased numbers of hyper-resorptive osteoclasts. *Nature Medicine*, 8(9), 943–949.
- Taniguchi, C. M., Emanuelli, B., & Kahn, C. R. (2006). Critical nodes in signalling pathways: Insights into insulin action. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 7, Issue 2, pp. 85–96). Nature Publishing Group.
- Tatsumi, S., Ishii, K., Amizuka, N., Li, M., Kobayashi, T., Kohno, K., Ito, M., Takeshita, S., & Ikeda, K. (2007). Targeted Ablation of Osteocytes Induces Osteoporosis with Defective Mechanotransduction. *Cell Metabolism*, 5(6), 464–475.
- Thomas, M. P., Erneux, C., & Potter, B. V. L. (n.d.). *SHIP2 : Structure , Function and Inhibition*.
- Thomas, M. P., Erneux, C., & Potter, B. V. L. (2017). SHIP2: Structure, Function and Inhibition. *ChemBioChem*, 18(3), 233–247.
- Tiosano, D., & Hochberg, Z. (2009). Hypophosphatemia: The common denominator of all rickets. In *Journal of Bone and Mineral Metabolism* (Vol. 27, Issue 4, pp. 392–401). Springer.
- Tomlinson, M. G., Heath, V. L., Turck, C. W., Watson, S. P., & Weiss, A. (2004). SHIP family inositol phosphatases interact with and negatively regulate the Tec tyrosine kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 279(53), 55089–55096.
- Toppets, Pastoret, Behr De, Antoine, Dessy, & Gabriel. (2004). Morphologie, croissance et remaniement du tissu osseux. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 148, 1–13.
- Touaitahuata, H., Cres, G., de Rossi, S., Vives, V., & Blangy, A. (2014). The mineral dissolution function of osteoclasts is dispensable for hypertrophic cartilage degradation during long bone development and growth. *Developmental Biology*, 393(1), 57–70.
- Tridandapani, S., Kelley, T., Cooney, D., Pradhan, M., & Coggeshall, K. M. (1997). Negative signaling in B cells: SHIP Grbs Shc. In *Immunology Today* (Vol. 18, Issue 9, pp. 424–427). Elsevier Ltd.
- Tyler, K., Sarioglu, N., & Kunze, J. (1999). Five familial cases of opsismodysplasia substantiate the hypothesis of autosomal recessive inheritance. *American Journal of Medical Genetics*, 83(1), 47–52.
- Ulici, V., Hoenselaar, K. D., Agoston, H., McLain, D. D., Umoh, J., Chakrabarti, S., Holdsworth, D. W., & Beier, F. (2009). The role of Akt1 in terminal stages of endochondral bone formation: Angiogenesis and ossification. *Bone*, 45(6), 1133–1145.
- Ulici, V., Hoenselaar, K. D., Gillespie, J. R., & Beier, F. (2008). The PI3K pathway regulates endochondral bone growth through control of hypertrophic chondrocyte differentiation. *BMC Developmental Biology*, 8, 1–15.
- Vande Catsyne, C. A., Sayyed, S. A., Molina-Ortiz, P., Moes, B., Communi, D., Muller, J., Heusschen, R., Caers, J., Azzi, A., Erneux, C., & Schurmans, S. (2020). Altered chondrocyte differentiation, matrix mineralization and MEK-Erk1/2 signaling in an INPPL1 catalytic knock-out mouse model of opsismodysplasia. *Advances in Biological Regulation*, 76.

- Vandenbroere, I., Paternotte, N., Dumont, J. E., Erneux, C., & Pirson, I. (2003). The c-Cbl-associated protein and c-Cbl are two new partners of the SH2-containing inositol polyphosphate 5-phosphatase SHIP2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 300(2), 494–500.
- Vanhaesebroeck, B., Guillermet-Guibert, J., Graupera, M., & Bilanges, B. (2010). The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 11, Issue 5, pp. 329–341). Nature Publishing Group.
- Vega, R. B., Matsuda, K., Oh, J., Barbosa, A. C., Yang, X., Meadows, E., McAnally, J., Pomajzl, C., Shelton, J. M., Richardson, J. A., Karsenty, G., & Olson, E. N. (2004). Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis. *Cell*, 119(4), 555–566.
- Vehlow, A., Soong, D., Vizcay-Barrena, G., Bodo, C., Law, A.-L., Perera, U., & Krause, M. (2013). Endophilin, Lamellipodin, and Mena cooperate to regulate F-actin-dependent EGF-receptor endocytosis. *EMBO Journal*, 32(20), 2722–2734.
- Venkatareddy, M., Cook, L., Abuarquob, K., Verma, R., & Garg, P. (2011). Nephhrin Regulates Lamellipodia Formation by Assembling a Protein Complex That Includes Ship2, Filamin and Lamellipodin. *PLoS ONE*, 6(12), e28710.
- Viaud, J., & Payrastre, B. (2015). Les phosphoinositides - Ces lipides qui coordonnent la dynamique cellulaire. *Médecine/Sciences*, 31(11), 996–1005.
- Vicinanza, M., Di Campli, A., Polishchuk, E., Santoro, M., Di Tullio, G., Godi, A., Levchenko, E., De Leo, M. G., Polishchuk, R., Sandoval, L., Marzolo, M. P., & De Matteis, M. A. (2011). OCRL controls trafficking through early endosomes via PtdIns4,5P 2-dependent regulation of endosomal actin. *EMBO Journal*, 30(24), 4970–4985.
- Wada, Sasaoka, T., Funaki, M., Hori, H., Murakami, S., Ishiki, M., Haruta, T., Asano, T., Ogawa, W., Ishihara, H., & Kobayashi, M. (2001). Overexpression of SH2-containing inositol phosphatase 2 results in negative regulation of insulin-induced metabolic actions in 3T3-L1 adipocytes via its 5'-phosphatase catalytic activity. *Molecular and Cellular Biology*, 21(5), 1633–1646.
- Waller, D. K., Correa, A., Vo, T. M., Wang, Y., Hobbs, C., Langlois, P. H., Pearson, K., Romitti, P. A., Shaw, G. M., & Hecht, J. T. (2008). The population-based prevalence of achondroplasia and thanatophoric dysplasia in selected regions of the US. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 146(18), 2385–2389.
- Walzer, S. M., Cetin, E., Gröbl-Barabas, R., Sulzbacher, I., Rueger, B., Girsch, W., Toegel, S., Windhager, R., & Fischer, M. B. (2014). Vascularization of primary and secondary ossification centres in the human growth plate. *BMC Developmental Biology*, 14(1), 36.
- Wang, G., Woods, A., Sabari, S., Pagnotta, L., Stanton, L. A., & Beier, F. (2004). RhoA/ROCK Signaling Suppresses Hypertrophic Chondrocyte Differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 279(13), 13205–13214.
- Wang, Menendez, A., Fong, C., ElAlieh, H. Z., Chang, W., & Bikle, D. D. (2014). Ephrin B2/EphB4 Mediates the Actions of IGF-I Signaling in Regulating Endochondral Bone Formation. *Journal of Bone and Mineral Research*, 29(8), 1900–1913.
- Wang, Nie, Y., Zhang, K., Xu, H., Ramelot, T. A., Kennedy, M. A., Liu, M., Zhu, J., & Yang, Y. (2018). Solution structure of SHIP2 SH2 domain and its interaction with a phosphotyrosine peptide from c-MET. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 656, 31–37.
- Wang, Spatz, M. K., Kannan, K., Hayk, H., Avivi, A., Gorivodsky, M., Pines, M., Yayon, A., Lonai, P., & Givol, D. (1999). A mouse model for achondroplasia produced by targeting fibroblast growth factor receptor 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(8), 4455–4460.
- Wang, Su, H. W., Hsu, Y. C., Shen, M. R., & Tang, M. J. (2006). A discoidin domain receptor 1/SHP-2 signaling complex inhibits  $\alpha 2\beta 1$ -integrin-mediated signal transducers and activators of transcription 1/3 activation and cell migration. *Molecular Biology of the Cell*, 17(6), 2839–2852.
- Wang, Sun, H. Q., Macia, E., Kirchhausen, T., Watson, H., Bonifacino, J. S., & Yin, H. L. (2007). PI4P promotes the recruitment of the GGA adaptor proteins to the trans-Golgi network and regulates their recognition of the ubiquitin sorting signal. *Molecular Biology of the Cell*, 18(7), 2646–2655.

- Wang, Y., Bikle, D. D., & Chang, W. (2013). Autocrine and Paracrine Actions of IGF-I Signaling in Skeletal Development. In *Bone Research* (Vol. 1, Issue 3, pp. 249–259). Sichuan University.
- Wang, Zhou, J., & Bondy, C. A. (1999). Igf1 promotes longitudinal bone growth by insulin-like actions augmenting chondrocyte hypertrophy. *FASEB Journal*, 13(14), 1985–1990.
- Webster, M. K., & Donoghue, D. J. (1996). Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor 3 by the transmembrane domain point mutation found in achondroplasia. *EMBO Journal*, 15(3), 520–527.
- Weise, M., De-Levi, S., Barnes, K. M., Gafni, R. I., Abad, V., & Baron, J. (2001). Effects of estrogen on growth plate senescence and epiphyseal fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(12), 6871–6876.
- Weksler, N. B., Lunstrum, G. P., Reid, E. S., & Horton, W. A. (1999). Differential effects of fibroblast growth factor (FGF) 9 and FGF2 on proliferation, differentiation and terminal differentiation of chondrocytic cells in vitro. *The Biochemical Journal*, 342 Pt 3(Pt 3), 677–682.
- Wesseling-Perry, K. (2010). FGF-23 in bone biology. *Pediatric Nephrology*, 25(4), 603–608.
- Whyte, M. P. (1994). Hypophosphatasia and the Role of Alkaline Phosphatase in Skeletal Mineralization\*. *Endocrine Reviews*, 15(4), 439–461.
- Wiessner, M., Roos, A., Munn, C. J., Viswanathan, R., Whyte, T., Cox, D., Schoser, B., Sewry, C., Roper, H., Phadke, R., Marini Bettolo, C., Barresi, R., Charlton, R., Bönnemann, C. G., Abath Neto, O., Reed, U. C., Zanolati, E., Araújo Martins Moreno, C., Ertl-Wagner, B., ... Senderek, J. (2017). Mutations in INPP5K, Encoding a Phosphoinositide 5-Phosphatase, Cause Congenital Muscular Dystrophy with Cataracts and Mild Cognitive Impairment. *American Journal of Human Genetics*, 100(3), 523–536.
- Wilkin, D. J., Szabo, J. K., Cameron, R., Henderson, S., Bellus, G. A., Mack, M. L., Kaitila, I., Loughlin, J., Munnich, A., Sykes, B., Bonaventure, J., & Francomano, C. A. (1998). Mutations in fibroblast growth-factor receptor 3 in sporadic cases of achondroplasia occur exclusively on the paternally derived chromosome. *American Journal of Human Genetics*, 63(3), 711–716.
- Wisniewski, D., Strife, A., Swendeman, S., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Kavanaugh, W. M., Tempst, P., & Clarkson, B. (1999). A Novel SH2-Containing Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate 5-Phosphatase (SHIP2) Is Constitutively Tyrosine Phosphorylated and Associated With src Homologous and Collagen Gene (SHC) in Chronic Myelogenous Leukemia Progenitor Cells. *Blood*, 93(8), 2707 LP – 2720.
- Wiśniewski, M., Baumgart, M., Grzonkowska, M., Siedlecki, Z., Piec, M., Szpinda, M., & Pawlak-Osińska, K. (2019). Quantitative anatomy of the primary ossification center of the radial shaft in human fetuses. *Surgical and Radiologic Anatomy*, 41(8), 901–909.
- Woods, A., & Beier, F. (2006). RhoA/ROCK signaling regulates chondrogenesis in a context-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry*, 281(19), 13134–13140.
- Woods, A., Wang, G., & Beier, F. (2005). RhoA/ROCK signaling regulates Sox9 expression and actin organization during chondrogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 280(12), 11626–11634.
- Woods, A., Wang, G., & Beier, F. (2007). Regulation of chondrocyte differentiation by the act in cytoskeleton and adhesive interactions. In *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 213, Issue 1, pp. 1–8). J Cell Physiol.
- Wu, X., Simpson, J., Hong, J. H., Kim, K. H., Thavarajah, N. K., Backx, P. H., Neel, B. G., & Araki, T. (2011). MEK-ERK pathway modulation ameliorates disease phenotypes in a mouse model of Noonan syndrome associated with the Raf1L613V mutation. *Journal of Clinical Investigation*, 121(3), 1009–1025.
- Wullschlegel, S., Wasserman, D. H., Gray, A., Sakamoto, K., & Alessi, D. R. (2011). Role of TAPP1 and TAPP2 adaptor binding to PtdIns(3,4) P2 in regulating insulin sensitivity defined by knock-in analysis. *Biochemical Journal*, 434(2), 265–274.
- Wuthier, R. E., & Lipscomb, G. F. (2011). Matrix vesicles: Structure, composition, formation and function in calcification. *Frontiers in Bioscience*, 16(7), 2812–2902.

- Xiao, G., Jiang, D., Gopalakrishnan, R., & Franceschi, R. T. (2002). Fibroblast growth factor 2 induction of the osteocalcin gene requires MAPK activity and phosphorylation of the osteoblast transcription factor, Cbfa1/Runx2. *Journal of Biological Chemistry*, 277(39), 36181–36187.
- Xie, Gol'din, P., Herdina, A. N., Estefa, J., Medvedeva, E. V., Li, L., Newton, P. T., Kotova, S., Shavkuta, B., Saxena, A., Shumate, L. T., Metscher, B., Großschmidt, K., Nishimori, S., Akovantseva, A., Arregui, I. L., Tafforeau, P., Fried, K., Carlström, M., ... Chagin, A. S. (2019). Evolution of the growth plate into a spatially separated structure allows bone growth on land. *BioRxiv*, 571612.
- Xie, Zhou, S., Chen, H., Du, X., & Chen, L. (2014). Recent research on the growth plate: Advances in fibroblast growth factor signaling in growth plate development and disorders. *Journal of Molecular Endocrinology*, 53, T11–T34.
- Xing, W., Cheng, S., Wergedal, J., & Mohan, S. (2014). Epiphyseal chondrocyte secondary ossification centers require thyroid hormone activation of Indian hedgehog and osterix signaling. *Journal of Bone and Mineral Research*, 29(10), 2262–2275.
- Xu, Shao, Y., Ren, L., Liu, X., Li, Y., Xu, J., & Ye, Y. (2020). IQGAP2 Inhibits Migration and Invasion of Gastric Cancer Cells via Elevating SHIP2 Phosphatase Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 1968.
- Yang, Andre, P., Ye, L., & Yang, Y. Z. (2015). The Hedgehog signalling pathway in bone formation. In *International journal of oral science* (Vol. 7, Issue 2, pp. 73–79). Nature Publishing Group.
- Yang, Fu, M., Ding, Y., Weng, Y., Fan, W., Pu, X., Ge, Z., Zhan, F., Ni, H., Zhang, W., Jin, F., Xu, N., Li, J., Qiu, L., Wang, J., & Gu, X. (2014). High SHIP2 expression indicates poor survival in colorectal cancer. *Disease Markers*, 2014, 218968.
- Yang, Z.-Q., Zhang, H.-L., Duan, C.-C., Geng, S., Wang, K., Yu, H.-F., Yue, Z.-P., & Guo, B. (2017). IGF1 regulates RUNX1 expression via IRS1/2: Implications for antler chondrocyte differentiation. *Cell Cycle*, 16(6), 522–532.
- Ye, Y., Ge, Y. M., Xiao, M. M., Guo, L. M., Li, Q., Hao, J. Q., Da, J., Hu, W. L., Zhang, X. D., Xu, J., & Zhang, L. J. (2016). Suppression of SHIP2 contributes to tumorigenesis and proliferation of gastric cancer cells via activation of Akt. *Journal of Gastroenterology*, 51(3), 230–240.
- Ye, Y., Jin, L., Wilmott, J. S., Hu, W. L., Yosufi, B., Thorne, R. F., Liu, T., Rizos, H., Yan, X. G., Dong, L., Tay, K. H., Tseng, H. Y., Guo, S. T., De Bock, C. E., Jiang, C. C., Wang, C. Y., Wu, M., Zhang, L. J., Hersey, P., ... Zhang, X. D. (2013). PI(4,5)P2 5-phosphatase A regulates PI3K/Akt signalling and has a tumour suppressive role in human melanoma. *Nature Communications*, 4, 1508.
- Yoon, B. S., & Lyons, K. M. (2004). Multiple functions of BMPs in chondrogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 93(1), 93–103.
- Yoshinaga, S., Ohkubo, T., Sasaki, S., Nuriya, M., Ogawa, Y., Yasui, M., Tabata, H., & Nakajima, K. (2012). A phosphatidylinositol lipids system, lamellipodin, and Ena/VASP regulate dynamic morphology of multipolar migrating cells in the developing cerebral cortex. *Journal of Neuroscience*, 32(34), 11643–11656.
- Young, & Kobluk. (1995). Disease of Bone. In *The horse* (pp. 737–790).
- Yu, & Cui, W. (2016). Proliferation, survival and metabolism: The role of PI3K/AKT/ mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. In *Development (Cambridge)* (Vol. 143, Issue 17, pp. 3050–3060). Company of Biologists Ltd.
- Yu, K., & Ornitz, D. M. (2008). FGF signaling regulates mesenchymal differentiation and skeletal patterning along the limb bud proximodistal axis. *Development*, 135(3), 483–491.
- Yu, Yoon, S. O., Poulgiannis, G., Yang, Q., Ma, X. M., Villén, J., Kubica, N., Hoffman, G. R., Cantley, L. C., Gygi, S. P., & Blenis, J. (2011). Phosphoproteomic analysis identifies Grb10 as an mTORC1 substrate that negatively regulates insulin signaling. *Science*, 332(6035), 1322–1326.
- Zeger, M. D., Adkins, D., Fordham, L. A., White, K. E., Schoenau, E., Rauch, F., & Loechner, K. J. (2007). Hypophosphatemic rickets in opsismodysplasia. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 20(1), 79–86.
- Zelzer, E., McLean, W., Ng, Y. S., Fukai, N., Reginato, A. M., Lovejoy, S., D'Amore, P. A., & Olsen, B. R. (2002). Skeletal defects in VEGF120/120 mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis. *Development*, 129(8), 1893–1904.
- Zeman, J., Baxova, A., Houstkova, H., & Kozlowski, K. (1997). Opsismodysplasia: A case report. *Australasian Radiology*,

- 41(1), 35–37.
- Zhang, J., Liu, Z., Rasschaert, J., Blero, D., Deneubourg, L., Schurmans, S., Erneux, C., & Pesesse, X. (2007). SHIP2 controls PtdIns(3,4,5)P3 levels and PKB activity in response to oxidative stress. *Cellular Signalling*, 19(10), 2194–2200.
- Zhang, Murakami, S., Coustry, F., Wang, Y., & De Crombrughe, B. (2006). Constitutive activation of MKK6 in chondrocytes of transgenic mice inhibits proliferation and delays endochondral bone formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(2), 365–370.
- Zhao, J., & Guan, J. L. (2009). Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer. In *Cancer and Metastasis Reviews* (Vol. 28, Issues 1–2, pp. 35–49).
- Zhong, M., Carney, D. H., Jo, H., Boyan, B. D., & Schwartz, Z. (2011). Inorganic phosphate induces mammalian growth plate chondrocyte apoptosis in a mitochondrial pathway involving nitric oxide and JNK MAP kinase. *Calcified Tissue International*, 88(2), 96–108.
- Zhou, Di, M., & Han, H. (2019). Upregulation of SHIP2 participates in the development of breast cancer via promoting Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *OncoTargets and Therapy*, Volume 12, 7067–7077.
- Zhou, von der Mark, K., Henry, S., Norton, W., Adams, H., & de Crombrughe, B. (2014). Chondrocytes Transdifferentiate into Osteoblasts in Endochondral Bone during Development, Postnatal Growth and Fracture Healing in Mice. *PLoS Genetics*, 10(12).
- Zhou, X., Liu, Y., & Tan, G. (2011). Prognostic Value of Elevated SHIP2 Expression in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Archives of Medical Research*, 42(7), 589–595.
- Zhou, Xie, Y., Li, W., Huang, J., Wang, Z., Tang, J., Xu, W., Sun, X., Tan, Q., Huang, S., Luo, F., Xu, M., Wang, J., Wu, T., Chen, L., Chen, H., Su, N., Du, X., Shen, Y., & Chen, L. (2016). Conditional Deletion of Fgfr3 in Chondrocytes leads to Osteoarthritis-like Defects in Temporomandibular Joint of Adult Mice. *Scientific Reports*, 6.
- Zhou, Z. Q., Ota, S., Deng, C., Akiyama, H., & Hurlin, P. J. (2015). Mutant activated FGFR3 impairs endochondral bone growth by preventing SOX9 downregulation in differentiating chondrocytes. *Human Molecular Genetics*, 24(6), 1764–1773.
- Zhou, Zheng, C., Chen, Y. T., & Chen, X. M. (2018). Underexpression of INPPL1 is associated with aggressive clinicopathologic characteristics in papillary thyroid carcinoma. *OncoTargets and Therapy*, 11, 7725–7731.
- Zoch, M. L., Clemens, T. L., & Riddle, R. C. (2016). New insights into the biology of osteocalcin. *Bone*, 82, 42–49.
- Zonana, J., Rimoin, D. L., Lachman, R. S., & Cohen, A. H. (1977). A unique chondrodysplasia secondary to a defect in chondroosseous transformation. In *Birth Defects: Original Article Series* (Vol. 13, Issue 3 D, pp. 155–163).
- Zoncu, R., Perera, R. M., Sebastian, R., Nakatsu, F., Chen, H., Balla, T., Ayala, G., Toomre, D., & De Camilli, P. V. (2007). Loss of endocytic clathrin-coated pits upon acute depletion of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(10), 3793–3798.
- Zuscik, M. J., Hilton, M. J., Zhang, X., Chen, D., & O’Keefe, R. J. (2008). Regulation of chondrogenesis and chondrocyte differentiation by stress. *Journal of Clinical Investigation*, 118(2), 429–438.
- Zwaenepoel, K., Goris, J., Erneux, C., Parker, P. J., & Janssens, V. (2010). Protein phosphatase 2A PR130/B $\alpha$ :1 subunit binds to the SH2 domain-containing inositol polyphosphate 5-phosphatase 2 and prevents epidermal growth factor (EGF)-induced EGF receptor degradation sustaining EGF-mediated signaling. *FASEB Journal*, 24(2), 538–547.

---

# Annexe

---



## ———— Section expérimentale

### Etude 2 :

The phosphoinositide 5-phosphatase INPP5K: from gene structure  
to in vivo functions.

———— *Advances in Biological Regulation ;78 (2020):100760*

Stéphane Schurmans, Charles-Andrew Vande Catsyne, Christophe Desmet, Bastien Moës





## The phosphoinositide 5-phosphatase INPP5K: from gene structure to *in vivo* functions

Stéphane Schurmans<sup>a,b,\*</sup>, Charles-Andrew Vande Catsyne<sup>a</sup>, Christophe Desmet<sup>c</sup>, Bastien Moës<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire de Génétique Fonctionnelle, GIGA-Research Centre, building B34, CHU Sart-Tilman, Université de Liège, avenue de l'Hôpital 11, 4000-Liège, Belgium

<sup>b</sup>Secteur de Biochimie Métabolique vétérinaire, Département des Sciences Fonctionnelles, Faculté de Médecine Vétérinaire, building B42, Université de Liège, Quartier Vallée 2, avenue de Cureghem 7A-7D, 4000-Liège, Belgium

<sup>c</sup>Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, GIGA-research centre, building B34, CHU Sart-Tilman, Université de Liège, avenue de l'Hôpital 11, 4000-Liège, Belgium.

### \*Corresponding author :

Laboratoire de Génétique Fonctionnelle, GIGA-Research Centre, building B34, CHU Sart-Tilman, Université de Liège, avenue de l'Hôpital 11, 4000-Liège, Belgium; phone : +32 4 3663372 ; email : [sschurmans@uliege.be](mailto:sschurmans@uliege.be)

**Keywords:** inositide, phosphoinositide, 5-phosphatase, INPP5K, SKIP, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, congenital muscular dystrophy, cataract, intellectual disability, insulin signaling, insulin resistance, endoplasmic reticulum, endoplasmic reticulum stress, unfolded protein response

**Abbreviations:** ER: endoplasmic reticulum; PtdIns(3,4,5)P3 : phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate ; PtdIns(4,5)P2 : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; UPR: unfolded protein response

***Abstract :***

INPP5K (Inositol Polyphosphate 5-Phosphatase K, or SKIP (for Skeletal muscle and Kidney enriched Inositol Phosphatase) is a member of the phosphoinositide 5-phosphatases family. Its protein structure comprises of a N-terminal catalytic domain which hydrolyses both PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> and PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, followed by a SKICH domain at the C-terminus which is responsible for protein-protein interactions and subcellular localization of INPP5K. Strikingly, INPP5K is mostly concentrated in the endoplasmic reticulum, although it is also detected at the plasma membrane, in the cytosol and the nucleus. Recently, mutations in INPP5K have been detected in patients with a rare form of autosomal recessive congenital muscular dystrophy with cataract, short stature and intellectual disability. INPP5K functions extend from control of insulin signaling, endoplasmic reticulum stress response and structural integrity, myoblast differentiation, cytoskeleton organization, cell adhesion and migration, renal osmoregulation, to cancer. The goal of this review is thus to summarize and comment recent and less recent data in the literature on INPP5K, in particular on the structure, expression, intracellular localization, interactions and functions of this specific member of the 5-phosphatases family.

### ***Introduction:***

Phosphatidylinositol (PtdIns) is composed of a glycerol backbone esterified to two fatty acid chains and a phosphate, and attached to a polar head group, the cyclic polyol *myo*-inositol, that extends into the cytoplasm. This inositol head group has free hydroxyl groups at positions D2 through D6, and those at positions D3, D4 and D5 can be phosphorylated into 7 potential combinations by 3-, 4- and 5-kinases, respectively. The 7 phosphorylated forms of phosphatidylinositol are named phosphoinositides, are present in cell membranes and play important role in many biological processes, essentially by interacting with specific proteins (Grabon et al., 2019). Indeed, each cellular membrane compartment has a characteristic composition of phosphoinositide species, and this phosphoinositide signature attracts a specific set of functionally important proteins to that membrane, or directly regulates the activity level of integral membrane proteins (Falkenburger et al., 2010). Beside kinases, phosphoinositide metabolism is also regulated by members of phospholipases C and phosphatases families. Phosphates added at positions D3, D4 and D5 of the inositol head group by kinases can be removed by 3-, 4- and 5-phosphatases, respectively (Blero et al., 2007). The mammalian 5-phosphatases family comprises 10 members. These members share an inositol 5-phosphatase domain with a set of conserved amino acids and a general comparable structural organization. Except for one member, INPP5A, they all catalyze the dephosphorylation of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> and/or PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> at the 5- position, generating PtdIns(4)P and/or PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>, respectively (Ramos et al., 2019a). Interestingly, 5-phosphatase isoenzymes have been individually implicated in human diseases, such as ciliopathies (INPP5E), the oculo-cerebrorenal syndrome of Lowe (INPP5F) or opsismodysplasia, a rare congenital skeletal dysplasia (INPPL1) (Ramos et al., 2019). The goal of this review is to summarize and comment recent and less recent data in the literature on INPP5K, in particular on the *in vivo* function of this member of the 5-phosphatases family in man and genetically-modified animals.

### **Official full name/symbol and synonym:**

The official full name for the *INPP5K* gene is Inositol Polyphosphate 5-Phosphatase K. However, *SKIP* (for Skeletal muscle and Kidney enriched Inositol Phosphatase) was first used when this 5-phosphatase was discovered by Takenawa's team in 2000 (Ijuin et al., 2000).

### **INPP5K gene, transcripts and proteins in man and mouse:**

The human *INPP5K* gene is located on the telomeric region of the short arm of chromosome 17 (17p13.3), on the reverse strand between nucleotides 1,494,577 and 1,516,742. The gene comprises 12 exons and generates a 2,706 bp transcript coding for a 448 amino acids protein with a theoretical 51.1 kDa molecular mass (Figure 1; e!Ensembl). Many splice variants of *INPP5K* are reported in public databases, giving potential proteins of 84 to 229 amino acids in length. However, the *in vivo* relevance of these transcripts is currently unknown. By contrast, two interesting transcripts containing insertions of 231 and 390 bp between exon 1 and 2 of the 2,706 bp transcript described above have been reported (Ijuin et al., 2000; e!Ensembl). They both lead to the production of the same 372 amino acids/42.7 kDa protein that lacks the first 76 amino acids of the 51.1 kDa INPP5K protein, probably by using a second Start codon present in exon 3. Both ~51.1 and ~42.7 kDa signals were detected in tissue and cell line protein extracts by Western blotting using an affinity-purified rabbit antibody directed against amino acid residues 137-448 of the human INPP5K protein (Ijuin et al., 2000). An additional ~36 kDa signal of unknown amino-acid sequence was also detected by Western blotting using an affinity-purified rabbit antibody raised against a fusion peptide representing the N- and C-terminal seven amino acids of human 51.1 kDa INPP5K protein (Gurung et al., 2003).

In mouse, the *Inpp5k* gene is located on the long arm of chromosome 11 (11qB5), on the forward strand between nucleotides 75,630,988 and 75,648,871. The mouse *Inpp5k* gene also comprises 12 exons, as in man, and generates a 2,679 bp transcript coding for a 468 amino acids protein with a theoretical molecular mass of 54.2 kDa (e!Ensembl). Two splice variants giving potential proteins of 39 and 112 amino acids in length are reported in the databases, but their *in vivo* relevance is unknown. When mouse tissues protein extracts were probed by Western blotting with an affinity-purified rabbit antibody raised against the RSFLREDTLYEPEPQI carboxy-terminal peptide of the INPP5K mouse protein, ~54 and ~42 kDa signals were clearly detected (Pernot et al., 2011). A third ~51 kDa signal was specifically observed in testis and brain and, in the kidney, a fourth ~36 kDa signal was also present in addition to the ~42 kDa signal (Pernot et al., 2011). The exact amino-acid sequence and origin of these 51, 42 and 36 kDa signals are currently unknown.

In conclusion, these results indicate that mouse and human *INPP5K* genes have a very similar structure and lead to the production of full length 54.2 and 51.1 kDa catalytically active INPP5K proteins, respectively. Additional truncated INPP5K proteins probably also arise from either alternative splicing, the use of alternative Start codon or simply from partial proteolysis, which are also detected by

Western blotting with specific antibodies. The exact biological activity of these truncated proteins is currently unknown.

### **Expression of INPP5K mRNAs and proteins in human and mouse tissues and cells:**

Results from Northern blotting, RT-PCR and Western blotting indicate that expression of INPP5K mRNA and protein is rather ubiquitous in human and mouse tissues and cells lines (Ijuin et al., 2000; Pernot et al., 2011). Importantly, INPP5K is particularly abundant in skeletal muscle, heart, brain, kidney, testis and eye (see below). Hematopoietic cells also express INPP5K mRNA and protein, including resting and activated lymphocytes, neutrophils, macrophages and dendritic cells (Pernot et al., 2011).

In addition to the full length 54.2 kDa mouse and 51.1 kDa human INPP5K proteins, mouse 51, 42 and 36 kDa signals as well as human 42.7 and 36 kDa signals were detected by Western blotting (Ijuin et al., 2000; Gurung et al., 2003; Pernot et al., 2011). Intriguingly, tissues and cell lines express either a single INPP5K protein or a combination of full length and/or truncated INPP5K proteins. For example, the mouse C2C12 cell line and mouse ovary only express the 42 kDa truncated protein. By contrast, full length 54.2 kDa and truncated 42 kDa proteins are both detected in mouse spleen. The most intriguing combination is probably in the mouse kidney where a very strong 36 kDa signal is associated with faint 54.2, 51 and 42 signals in the cortex, whereas faint 42 and 36 kDa signals are detected in the medulla (Pernot et al., 2011).

Physiological and physiopathological conditions associated with an increased INPP5K mRNA/protein expression include skeletal muscle cell differentiation (Xiong et al., 2011; Ijuin and Takenawa, 2012a), endoplasmic reticulum stress and activation of the unfold protein response (Ijuin et al., 2015a) as well as insulin resistance, obesity and diabetes (Ijuin et al., 2015a). In cancer, *INPP5K* mRNA expression was found either significantly increased (endometrial carcinoma (Hedberg Oldfors et al., 2015), prostate cancer (Flaig et al., 2017), glioblastoma (Davies et al., 2015), renal cancer (Jones et al., 2005)) or decreased (lung adenocarcinoma (Gao et al., 2017), glioblastoma (Davies et al., 2015)), depending on the cancer cell type.

### **Human and mouse INPP5K protein structure and catalytic activity:**

When compared to the human 448 amino-acids/51.1 kDa INPP5K protein, the mouse 468 amino-acids/54.2 kDa INPP5K protein is characterized by the presence of an additional peptide of 18 residues of unknown function at the N-terminus. With the exception of this peptide at the N-terminus, human and mouse INPP5K protein structure is identical and simple: a catalytic domain comprising of the two conserved and specific motifs of the 5-phosphatases family is present at the amino-terminus of the protein (residues 12-326 of the human 51.1 kDa protein and 30-345 of the murine 54.2 kDa protein), followed by a SKICH domain at the carboxy-terminus (residues 332-431 of the human 51.1 kDa protein and 351-450 of the murine 54.2 kDa protein) (Figure 1). Accordingly, the human 372 amino acids/42.7

kDa protein described above, which lacks the first 76 amino acids of the 51.1 kDa full length INPP5K protein, is unlikely to harbor 5-phosphatase activity.

INPP5K hydrolyses both PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> and PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, but exhibits greatest activity towards PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (Ijuin et al., 2000; Gurung et al., 2003; Schmid et al., 2004; Pernot et al., 2011). No phosphatase activity was detected against PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>, PtdIns(5)P, Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> or Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> (Gurung et al., 2003; Schmid et al., 2004).

The ~100 amino-acid SKICH domain (for SKIP carboxy-homology domain) has an Ig-like  $\beta$ -barrel structure and a molecular surface dominated by negatively charged regions which may interact with components of the plasma membrane (Yang et al., 2015). The SKICH domain and surrounding sequences present at the C-terminus of INPP5K mediates interactions with specific proteins and regulate intracellular localization (Gurung et al., 2003; Dong et al., 2018). For example, after growth factor/insulin stimulation, the SKICH domain mediates INPP5K translocation from its endoplasmic reticulum localization in basal conditions to the plasma membrane. The SKICH domain of INPP5K is composed of a core sequence allowing a constitutive plasma membrane association and of surrounding sequences specific to INPP5K that contribute to endoplasmic reticulum localization of the protein in basal conditions (Gurung et al., 2003; Dong et al., 2018).

#### **INPP5K interacting proteins:**

Lists of proteins potentially interacting with the INPP5K protein are available in BioGRID (37 potential interactors), CORUM (1 potential complex: ID 2639, the HES1 promoter-Notch enhancer complex), IntAct (38 potential interactors), MINT (7 potential interactors) and STRING (10 predicted functional partners) public databases and are summarized on [www.uniprot.org/uniprot/Q9BT40](http://www.uniprot.org/uniprot/Q9BT40). The present review will be limited to 6 interacting proteins which have been carefully analyzed by different teams as part of specific studies on INPP5K.

#### *GRP78/BiP/HSP5a and activated PAK1:*

Ijuin and collaborators proposed a model in which, in basal conditions, cytosolic INPP5K directly interacts via its SKICH domain with GRP78/Glucose regulated protein 78, a luminal ER chaperone protein involved in ER stress and the UPR (Ijuin and Takenawa, 2012b, 2015a, 2015b, 2015c and 2016). However, in this model, the unresolved issue is how INPP5K which is present in the cytosol and at the cytosolic side of the ER membrane interacts with luminal ER GRP78 (Ijuin et al., 2016). After insulin stimulation, the INPP5K-GRP78 complex migrates from ER to the plasma membrane, where activated PAK1/p21-activated protein kinase 1 competitively binds through a 11 amino-acids peptide within its kinase domain to INPP5K in place of GRP78, linking INPP5K to the complex of proteins associated with the insulin receptor. Binding of INPP5K to activated PAK1 and this complex via its SKICH domain leads to PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> dephosphorylation, decreased AKT2 phosphorylation and insulin signaling inactivation (see below for the physiologic effect of this regulation). The co-

immunoprecipitation of expressed tagged INPP5K and GRP78 proteins was reproduced by another team (Wiessner et al., 2017).

#### *SODD/BAG4:*

According to Rahman and collaborators, the direct interaction between the molecular co-chaperone SODD/Silencer of Death Domains and INPP5K following growth factor stimulation exerts an inhibitory effect on INPP5K PtdIns(3,4,5)P3 5-phosphatase catalytic activity. Consequently, this interaction enhances the recruitment of PtdIns(3,4,5)P3-effectors at the plasma membrane and reduces that of PtdIns(3,4)P2, resulting in a tight regulation of actin polymerization, cell adhesion, spreading and migration (Rahman et al., 2011). Upon growth factor stimulation, SODD co-localized with INPP5K both in the cytosol and at the plasma membrane. No interaction was detected in basal conditions. In contrast, *SODD*<sup>-/-</sup> mouse embryonic fibroblasts exhibited reduced AKT phosphorylation following growth factor stimulation, associated with increased INPP5K PtdIns(3,4,5)P3-5-phosphatase activity (Rahman et al., 2011).

#### *ARL6IP1:*

ARL6IP1/ADP Ribosylation Factor Like GTPase 6 Interacting Protein 1 is a protein with reticulon-like features whose mutations result in hereditary spastic paraplegia, a pathology frequently associated with dysfunction of proteins that control ER morphology (Blackstone et al., 2011; Novarino et al., 2014; Yamamoto et al., 2014; Nizon et al., 2018). ARL6IP1 is embedded in the ER membrane via 4 transmembrane domains but its N- and C-terminal regions protrude in the cytosol (Dong et al., 2018). Dong and collaborators convincingly demonstrated that the interaction with ER ARL6IP1 protein is responsible for INPP5K recruitment from the cytosol to the cytosolic side of the ER membrane and that, like ARL6IP1, INPP5K is enriched in newly formed ER tubules. Importantly, knockdown of either protein resulted in structural ER alterations (Dong and al., 2018; Ramos et al., 2020). The ARL6IP1 cytosolic N-terminal region and a surface of INPP5K at the interface of the catalytic domain and the SKICH domain were implicated in the INPP5K-ARL6IP1 interaction (Dong et al., 2018).

#### *MAD2L1BP/p31(comet)/CMT2:*

Yeast-two-hybrid analysis revealed MAD2L1BP/MAD2L1 binding protein, a nuclear-enriched protein binding to the mitotic spindle assembly checkpoint MAD2A protein during cell cycle surveillance, as a potential INPP5K interactor (Rual et al., 2005). In EGFP-INPP5K-expressing HeLa cells, mCherry-MAD2L1BP co-expression resulted in a massive translocation of INPP5K from ER to the nucleus and in a marked nuclear INPP5K accretion (Dong et al., 2018). However, the interaction between native proteins was not analyzed and interacting domains in INPP5K and MAD2L1BP proteins were not defined. Thus, the physiological relevance of this interaction remains to be defined.



### *2/5C HBV core protein:*

Interestingly, the SKICH domain of INPP5K was reported to interact with amino acids 116-149 of the 2/5C human hepatitis B virus (HBV) core protein (Hung et al., 2009). The interaction with 2/5C HBV core protein induces INPP5K migration from ER to the nucleus.

### **Intracellular localization of INPP5K:**

In non-stimulated conditions, immunofluorescence studies revealed that both endogenous and exogenous tagged INPP5K proteins are mostly concentrated in the ER, co-localizing with calreticulin and calnexin ER markers, and that little or no staining is detected at the plasma membrane (Ijuin et al., 2000; Gurung et al., 2003; Dong et al., 2018; Ramos et al., 2018, 2020). As mentioned above, at the cytosolic side of the ER membrane, INPP5K binds to the N-terminal region of ARL6IP1 which protrudes in the cytosol (Dong et al., 2018). Interaction of INPP5K with luminal ER GRP78 has also been described, but the molecular mechanism is still unresolved (Ijuin et al., 2016). It is noteworthy here that mammalian INPP5K shares this ER localization with the yeast phosphoinositide 5-phosphatase Inp54p. Inp54p is a 44 kDa protein which consists of a N-terminal PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> 5-phosphatase domain and a C-terminal leucine-rich tail that is sufficient to target the protein to the cytosolic side of the ER membrane (Wiradjaja et al., 2001). After growth factor or insulin stimulation, INPP5K is transiently translocated from the ER to the plasma membrane, where it could bind to activated PAK1, SODD or still undefined plasma membrane ligands via its SKICH domain (see above). At the plasma membrane, INPP5K co-localizes with submembranous actin at the leading edge of the cell, specifically at membrane ruffles (Gurung et al., 2003; Ijuin and Takenawa, 2003, 2012b, 2016). Finally, Ramos and collaborators recently reported that INPP5K, beside its known ER, plasma membrane and cytosolic localizations, is also present in the nucleus of the human U-251 malignant glioblastoma (MG) cell line (Ramos et al., 2020). In this cell line, about half of the nuclear INPP5K staining co-localized with SC-35<sup>+</sup> speckles, where PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> has been previously detected.

### **INPP5K mutations are responsible for a rare form of autosomal recessive congenital muscular dystrophy with cataract, short stature and intellectual disability in man:**

In 2017, 2 research teams reported that biallelic mutations in the *INPP5K* gene cause a form of congenital muscular dystrophy with early-onset cataract, short stature and cognitive impairment (gene/locus MIM: 607875; phenotype MIM: 617404) (Wiessner et al., 2017; Osborn et al., 2017). A total of 9 causative *INPP5K* alleles were identified: 7 in the catalytic region and 2 in the SKICH domain (Figure 1). All 7 catalytic mutants and one of the SKICH domain mutant (p.Asn417Lysfs\*26) exhibited moderate to severe decrease in PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> phosphatase activity *in vitro*, as compared with control INPP5K protein (Wiessner et al., 2017; Osborn et al., 2017). The second SKICH domain mutant, p.Ile363Thr, had normal PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> phosphatase activity but displayed a striking tendency for a more diffuse intracellular distribution in transfected cells than control INPP5K protein (Wiessner et al., 2017).

It is noteworthy here that patients homozygous for the p.Ile50Thr catalytic mutant had a variable penetrance for muscular dystrophy and intellectual disability, leaving in one patient the ocular manifestation as the main phenotype and suggesting a role for epigenetic factors and/or genetic modifiers in the phenotype (Yousaf et al., 2018). Electromyography showed myopathic changes in the muscles of all affected individuals tested, in association with normal sensory and motor nerve conduction. Muscle pathology was largely non-specific, showing variable degrees of dystrophic features, including increased range of muscle fiber size and diameter, muscle fibrosis, excess adipose tissue, occasional fibers with centrally located nuclei or vacuoles, rare necrotic fibers, and a few basophilic regenerating fibers. There were no abnormalities of blood vessels, inflammatory changes, or group atrophy. Immunohistochemical analysis of classical skeletal muscle markers was normal, except for  $\alpha$ -dystroglycan expression, which was reduced in 2 of the 12 affected individuals tested (Wiessner et al., 2017; Osborn et al., 2017). Transmission electron microscopy revealed several fibers with pronounced reduction of myofibrils and disrupted Z line material (Wiessner et al., 2017). Unfortunately, attempts to identify alterations in biological processes in which INPP5K had been previously implicated (see below) were unsuccessful, and thus the pathogenic mechanism of this rare congenital muscle disease remains totally unknown. Indeed, skin fibroblasts from individuals homozygous for the p.Ile50Thr INPP5K mutation and from control subjects showed no difference in AKT phosphorylation in response to IGF-II stimulation, in the expression of markers of the unfolded protein response (UPR, an ER stress reaction), nor in the levels of autophagy markers in response to rapamycin and bafilomycin A1 treatment. Finally, all 4 INPP5K mutant proteins tested, including p.Ile363Thr in the SKICH domain, bound to GRP78 in a similar way to control INPP5K (Wiessner et al., 2017). In connection with the congenital muscular dystrophy observed in human INPP5K mutants, it is important to note that 3 single nucleotide polymorphisms (SNPs) located in intron 1 and 6 as well as in exon 12 of the porcine *INPP5K* gene have been associated with some meat traits, including muscle fiber number (Xiong et al., 2011, 2012). Furthermore, INPP5K gene-modified *Pps*<sup>Brdm1/+</sup> heterozygous mice had higher amounts of quadriceps muscle compared with wild-type mice (Ijuin et al., 2008).

### **INPP5K functions in cellular and animal models:**

*The zebrafish as a model for the human congenital muscular dystrophy caused by biallelic mutations in the INPP5K gene:*

Inpp5k is present in two copies in the zebrafish genome: inpp5ka and inpp5kb, with 48 and 44% identity to human INPP5K, respectively. At 1 and 2 days post-fertilization (dpf), mRNA quantification indicated that inpp5ka is respectively 7- and 16-fold higher expressed than inpp5kb (Osborn et al., 2017). *In vivo* experiments were conducted either by injecting inpp5ka-, inpp5kb- or inpp5ka- and Inpp5kb-specific morpholinos (MOs) in embryos (Osborn et al., 2017; Wiessner et al., 2017), or on a zebrafish line carrying an inpp5ka nonsense allele (p.Gln440\*, resulting in a C-terminal 12 amino acids deletion,

a probable hypomorph allele) (Yousaf et al., 2018). Injections of inpp5ka or inpp5ka and inpp5kb MOs in fertilized oocytes led to a phenotype that closely resembles the human presentation, including myopathy, reduced mobility, lens disorganization, microphthalmia, reduced growth, and microcephaly. In contrast, inpp5kb MOs alone showed only a very mild phenotype. Histologically, sparser and disorganized myofibers, altered sarcomere assembly, and reduced synaptic formation were observed in skeletal muscle of inpp5k knockdown embryos. In inpp5k morphants, the lens cortex was disorganized and cell nuclei were present in the center of the lens nucleus, a phenotype reminiscent of congenital cataracts in man. The p.Gln440\* zebrafish line displayed a very similar lens phenotype, while the skeletal muscle phenotype was much less severe than observed in MOs-injected embryos (Yousaf et al., 2018).

*Insulin signaling and insulin resistance:*

As already mentioned above, according to Ijuin and collaborators, INPP5K is localized at the cytosolic side of the ER membrane in non-stimulated conditions, directly interacting with ER luminal GRP78 (Ijuin and Takenawa, 2012b, 2015a, 2015b, 2015c and 2016). Following insulin stimulation, the INPP5K-GRP78 complex migrates to the plasma membrane, where activated PAK1 competitively binds to INPP5K in place of GRP78, linking INPP5K to the complex of proteins associated with the insulin receptor. Binding of INPP5K to this complex through activated PAK1 leads to PtdIns(3,4,5)P3 dephosphorylation, decreased AKT2, p70 S6 kinase and Glycogen Synthase activation, GLUT4 translocation, membrane ruffle formation and results in insulin signaling inactivation. Inversely, decreasing INPP5K expression in cells or in *INPP5K* gene-modified *Pps<sup>Brdm1/+</sup>* heterozygous mice resulted in an increased insulin signaling and sensitivity in muscle cells and, in *Pps<sup>Brdm1/+</sup>* mice, a reduced diet-induced obesity (Ijuin and Takenawa, 2003, 2008; Xiong et al., 2009). Finally, INPP5K expression was increased in skeletal muscles isolated from high fat diet-fed mice and diabetic/obese db/db mice, as compared to wild-type mice, linking INPP5K to these diseases (Ijuin et al., 2015a). In this context, it is noteworthy that culture medium supplementation with a synthetic peptide containing the amino acids sequence of the PAK1 kinase domain which interacts with INPP5K increased insulin signaling in muscle cell lines, probably by interfering with the formation of the INPP5K-PAK1 complex (Ijuin and Takenawa, 2015b).

*ER stress, the unfolded protein response (UPR) and insulin resistance:*

The UPR is triggered essentially in response to ER defects in N-linked glycosylation and disulfide bond formation, leading to accumulation of unfolded/misfolded proteins in the ER lumen (i.e. ER stress). ER stress can be secondary to intracellular alterations (e.g., calcium or redox imbalances, glucose deprivation), microenvironmental conditions (e.g., hypoglycemia, hypoxia, acidosis, viral infection), high-fat diet/obesity, a variety of natural compounds (e.g., thapsigargin, tunicamycin), and

several prescription drugs. Physiological processes like a vigorous protein production and secretion (e.g. immunoglobulins in plasma cells, digestive enzymes in exocrine pancreas and intestine) or muscle cell contraction during intense/prolonged exercise also trigger the UPR. The GRP78 molecular chaperone, one of the INPP5K interacting proteins (see above), plays a central role in the UPR by binding to and inactivating 3 stress sensors present in the ER membrane: IRE1 $\alpha$ , ATF6 and PERK. Briefly, accumulation of unfolded/misfolded proteins in the ER lumen displaces the GRP78 chaperone from these sensors to exposed hydrophobic residues on abnormally folded proteins. Activation of these 3 sensors results *in fine* in a decreased protein translation, increased production of molecular chaperones involved in protein folding, degradation of unfolded proteins by the proteasome and cell cycle arrest. If the UPR is prolonged or failed, cellular apoptosis occurs. Ijuin and colleagues showed that UPR activation lead to an increased expression of INPP5K mRNA and protein in C2C12 muscle cells and this contributed, as explained above, to decreased insulin signaling, i.e. insulin resistance. (Ijuin et al., 2016). XBP1 transcription factor was involved in this increased expression. Increased skeletal muscle INPP5K expression was also observed in diet-induced and genetic models of obesity in mice where the UPR is chronically activated, suggesting a link between high-fat diet, obesity, the UPR (including XBP1), INPP5K expression and insulin resistance.

#### *ER structural integrity:*

Dong and collaborators elegantly demonstrated that INPP5K interacts with the N-terminus of ARL6IP1 at the cytosolic side of the ER membrane (Dong et al., 2018). Both proteins are enriched in highly motile, elongating peripheral ER tubules, relative to perinuclear ER sheets, and were absent from the nuclear membrane. Interestingly, knock-down of INPP5K or ARL6IP1 resulted in a similar decrease in ER tubules and expansion of ER sheets at the cell periphery. Both the INPP5K SKICH domain and 5-phosphatase activity were shown to be essential to keep a normal ER structure. Yet, using GFP-PH PLC $\delta$ 1 as a fluorescent probe to monitor PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> levels, no change in the localization and/or level of the fluorescent signal was detected in INPP5K knock-down cells (Dong et al., 2018). Defects in ER architecture and lower abundance of peripheral ER tubules were also observed in *C. elegans* neurons and human glioblastoma cell lines when INPP5K (or CIL-1, its *C. elegans* orthologue) was silenced (Dong et al., 2018; Ramos et al., 2020). Importantly, three CIL-1 mutations (I39T, Y261C, and I327T) corresponding to INPP5K mutations found in human muscular dystrophic patients did not rescue the ER morphology phenotype when expressed in *C. elegans* CIL-1-deficient neurons, on the contrary to the wild type CIL-1 protein (Dong et al., 2018).

#### *Myoblasts differentiation and control of the IGF-II autocrine regulatory loop:*

Expression of INPP5K mRNA and protein increased during C2C12 cell differentiation into myotubes. In addition, MyoD, a transcription factor essential for myoblast specification during embryogenesis and in adults, induced INPP5K mRNA expression in these cells, partly via cis-acting

elements in the INPP5K promoter (Xiong et al., 2011; Ijuin and Takenawa, 2012a). C2C12 cell differentiation into myotubes was decreased when INPP5K was overexpressed and, inversely, endogenous INPP5K silencing was associated with increased myotubes formation. A model was proposed by Ijuin and colleagues where INPP5K controls the IGF-II autocrine regulatory loop and thus myoblast differentiation (Ijuin and Takenawa, 2012a). Indeed, during myoblast differentiation, IGF-II up-regulates its own gene expression through the PI3kinase/PtdIns(3,4,5)P3/AKT/mTOR signaling pathway, leading to IGF-II production and secretion in the extracellular space. Secreted IGF-II binds to IGF-1 receptor on myoblasts and initiate an autocrine/paracrine loop that plays a major role during differentiation (Ren et al., 2008; Duan et al., 2010; Jiao et al., 2013, and references therein). In the proposed model, INPP5K dephosphorylates PtdIns(3,4,5)P3 in the IGF-II signaling pathway, leading to decreased AKT/mTOR phosphorylation and IGF-II mRNA and protein production, acting thus as a brake on this positive autocrine loop. This mechanism could explain why INPP5K overexpression in C2C12 cells decreased myoblast differentiation and why decreased endogenous INPP5K expression in these cells and in INPP5K gene-modified *Pps<sup>Brdm1/+</sup>* heterozygous mice led to significantly increased differentiation into myotubes and quadriceps muscle weight compared to controls (Ijuin et al., 2008, 2012a).

*Cytoskeleton organization, cell adhesion and migration:*

Following cell stimulation by growth factors like Epidermal Growth factor (EGF) or integrin activation during cell adhesion, INPP5K translocates from the ER to the plasma membrane and co-localized with submembranous actin and membrane ruffles (Gurung et al., 2003; Ijuin and Takenawa, 2003; Davies et al., 2015; Ramos et al., 2019b). In these conditions, decreasing INPP5K expression in cancer cell lines had no impact on cell proliferation or survival, but resulted in increased PtdIns(4,5)P2 levels and decreased cell migration (Davies et al., 2015; Ramos et al., 2019b). By contrast, INPP5K overexpression suppressed growth factor-induced PtdIns(3,4,5)P3/AKT signaling and cell growth, and reduced the recruitment of PI(4,5)P2-binding proteins to the plasma membrane, lamellipodia formation and Talin incorporation into focal adhesions (Davies et al., 2015).

*Renal osmoregulation:*

Transgenic mice ubiquitously overexpressing tagged mouse INPP5K protein presented defects in water metabolism characterized by a reduced plasma osmolality at baseline, a delayed urinary water excretion following a water load, and an increased acute response to vasopressin. These defects were associated with the expression of the *Inpp5k* transgene in renal collecting ducts and with alterations in the arginine vasopressin/aquaporin-2 signalling pathway in this tubular segment. Analysis in a mouse collecting duct mCCD cell line revealed that INPP5K overexpression lead to increased expression of the arginine vasopressin receptor type 2 and increased cAMP response to arginine vasopressin, providing a basis for increased aquaporin-2 expression and plasma membrane localization with

increased osmotically-induced water transport. Altogether, these results indicated that INPP5K is important for the control of the arginine vasopressin/aquaporin-2 signalling pathway and water transport in kidney collecting ducts.

### **INPP5K association with other biological processes and human diseases:**

As mentioned above, *INPP5K* mRNA expression was found either increased or decreased in cancer, depending on the cancer cell type, but the exact consequence on cancer physiopathology remains unclear. By contrast, Ramos and colleagues recently showed that INPP5K depletion in the U-87 MG glioblastoma cell line resulted in increased viability and decreased apoptosis, and that these cells generated significantly larger tumors when injected in SCID mice, compared with controls (Ramos et al., 2020).

Association studies also revealed links between the *INPP5K* gene and autophagy (Zirin et al., 2015), Parkinson (Nazeri et al., 2015; Zhu et al., 2018; Liu et al., 2019) and Alzheimer diseases (Rahman et al., 2020).

### **Conclusion, questions and future directions:**

In 2017, mutations in INPP5K have been detected in patients with a rare form of autosomal recessive congenital muscular dystrophy. All causative *INPP5K* alleles detected so far result in decreased catalytic activity or altered subcellular localization of the protein. Muscle pathology is largely non-specific in patients as in *inpp5k* knockdown zebrafish, a model used to mimic the human disease. Unfortunately, the pathogenic mechanism of this muscle disease remains totally unknown. In particular, no difference in AKT phosphorylation was detected between patients and control fibroblasts in response to IGF-II stimulation, even though numerous cellular studies seemed to point this growth factor (or insulin)/PI3kinase/ PtdIns(3,4,5)P3/AKT axis as a good candidate for the pathogenic mechanism of this disease. The precise intracellular localization of INPP5K in muscle cells will probably give some ideas about the mechanism of action of INPP5K in this cell type and the physiopathology of this muscular dystrophy. Precisions about the human phenotype are also needed: why do patients with the same INPP5K mutation have so variable penetrance of muscular dystrophy and intellectual disability? Are INPP5K patients also insulin hypersensitive, like INPP5K gene-modified *Pps<sup>Brdm1/+</sup>* heterozygous mice? Conversely, do these INPP5K heterozygous mice have muscle histological alterations similar to INPP5K patients or INPP5K-depleted zebrafish?

More generally, in light of the information in this review, it will be important to discover the specific physiological and functional relevance, if any, of human 42.7 and 36 kDa as well as mouse 51, 42 and 36 kDa INPP5K proteins, to further analyze the interaction of INPP5K with MAD2L1BP and the transfer of this complex into the nucleus, as well as the physiological and functional role of INPP5K

in this specific subcellular compartment, in relation with nuclear PtdIns(4,5)P2 levels. In the same line of thought, the impact of INPP5K inactivation on ER *functional* integrity, beside *structural* integrity (e.g. protein and lipid syntheses, protein glycosylation, calcium signaling,...) and on ER phosphoinositide levels should also be investigated. Finally, Ijuin and colleagues reported that INPP5K gene-modified  $Pps^{Brdm1/Brdm1}$  homozygous mice died early during embryonic life of unknown causes (Ijuin et al., 2008). We have generated *Inpp5k* floxed and then *Inpp5k*<sup>Δ/Δ</sup> mice and we could confirm that the latter mice died during embryonic life, as  $Pps^{Brdm1/Brdm1}$  mice. Our floxed mice as well as those recently generated by McCabe (McCabe et al., 2019) will certainly help to answer to most of the above questions and will probably allow discovering the exact INPP5K function during eye development and in lens cortex, neurons and brain as well as skeletal muscle. The analysis of INPP5K floxed mice will probably reveal a wider phenotype than in INPP5K patients, with alterations involving more biological processes and organs, given that human INPP5K mutations do not completely abolish the 5-phosphatase catalytic activity or function.

Altogether, the analysis of this original phosphoinositide 5-phosphatase will certainly give some surprising and interesting results about its role and its PtdIns(4,5)P2 and PtdIns(3,4,5)P3 substrates in physiology and physiopathology in many organs, cells and subcellular localizations.

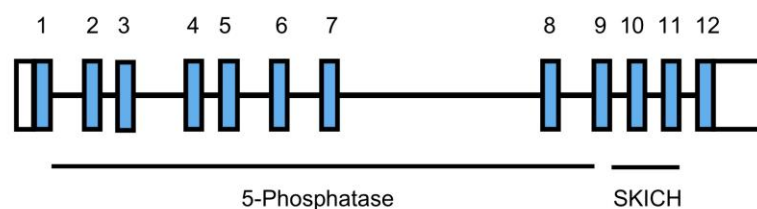
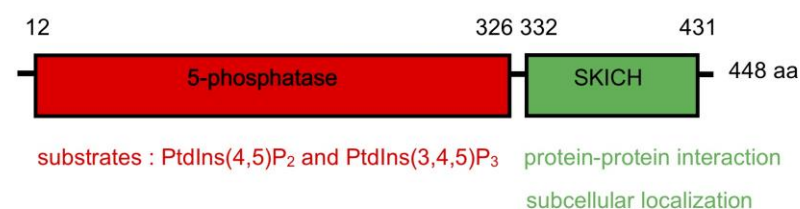
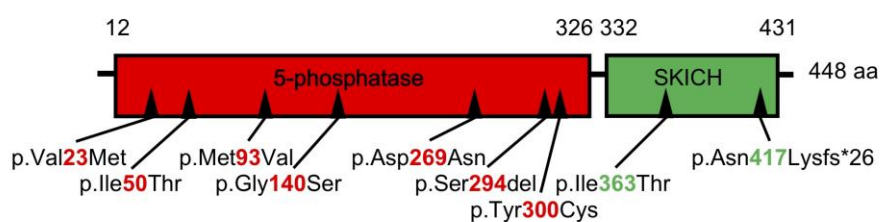
**Disclosure of conflicts of interest:**

The authors disclose no potential conflicts of interest. All authors approved the final manuscript.

**Acknowledgments:**

CAVC and BM are supported by a FRIA grant from the belgian FNRS. CD is a research associate of the belgian FNRS.



**Figure :****DNA :****PROTEIN :****MUTATIONS:****Figure 1: The human INPP5K gene and protein, as well as mutations discovered in patients.**

The top panel represents the relationship between exons (blue boxes) and the 5-phosphatase and SKICH domains of the INPP5K protein. White boxes are 5' and 3' untranslated regions. The central panel represents the different domains of the Rasa3 protein with their known functions. The lower panel shows the 9 mutations discovered so far in patients with a rare form of autosomal recessive congenital muscular dystrophy.

## References :

- Blackstone, C., O'Kane, C. J., Reid, E., 2011. Hereditary spastic paraplegias: membrane traffic and the motor pathway. *Nat. Rev. Neurosci.* 12: 31-42.
- Blero, D., Payraastre, B., Schurmans, S., Erneux, C., 2007. Phosphoinositide phosphatases in a network of signaling reactions. *Pflug Arch. Eur. J. Phy.* 455: 31-44.
- Davies, E. M., Kong, A. M., Tan, A., Gurung, R., Sriratana, A., Bukczynska, P. E., Ooms, L. M., McLean, C. A., Tiganis, T., Mitchell, C. A., 2015. Differential SKIP expression in PTEN-deficient glioblastoma regulates cellular proliferation and migration. *Oncogene* 34: 3711-27.
- Dong, R., Zhu T., Benedetti L., Gowrishankar S., Deng H., Cai Y., Wang X., Shen K., De Camilli P., 2018. The inositol 5-phosphatase INPP5K participates in the fine control of ER organization. *J. Cell. Biol.* 217: 3577-3592.
- Duan, C., Ren, H., Gao, S., 2010. Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF-binding proteins: Roles in skeletal muscle growth and differentiation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 167: 344-51.
- Falkenburger, B. H., Jensen, J. B., Dickson, E. J., Suh, B.-C., Hille, B., 2010. Phosphoinositides: lipid regulators of membrane proteins. *J. Physiol.* 588.17: 3179–3185.
- Flaig, T. W., Salzmänn-Sullivan, M., Su, L. J., Zhang, Z., Joshi, M., Gijon, M. A., Kim, J., Arcaroli, J. J., Van Bokhoven, A., Lucia, M. S., La Rosa, F. G., Schlaepfer, I. R., 2017. Lipid catabolism inhibition sensitizes prostate cancer cells to antiandrogen blockade. *Oncotarget* 8: 56051-56065.
- Gao, L., Ye, M., Lu, X., Huang, D., 2017. Hybrid method based on information gain and support vector machine for gene selection in cancer classification. *Genomics Proteomics Bioinform.* 15: 389-395.
- Grabon, A., Bankaitis, V. A., McDermott, M. I., 2019. The interface between phosphatidylinositol transfer protein function and phosphoinositide signaling in higher eukaryotes. *J. Lipid Res.* 60: 242-268.
- Gurung, R., Tan, A., Ooms, L. M., McGrath, M. J., Huysmans, R. D., Munday, A. D., Prescott, M., Whisstock, J. C., Mitchell, C. A., 2003. Identification of a novel domain in two mammalian inositol-polyphosphate 5-phosphatases that mediates membrane ruffle localization. The inositol 5-phosphatase skip localizes to the endoplasmic reticulum and translocates to membrane ruffles following epidermal growth factor stimulation. *J. Biol. Chem.* 278: 11376-85.
- Hedberg Oldfors, C., Dios, D. G., Linder, A., Visuttijai, K., Samuelson, E., Karlsson, S., Nilsson, S., Behboudi, A., 2015. Analysis of an independent tumor suppressor locus telomeric to Tp53 suggested Inpp5k and Myo1c as novel tumor suppressor gene candidates in this region. *BMC Genet.* 16:80. doi: 10.1186/s12863-015-0238-4.
- Hung, C. S., Lin, Y. L., Wu, C. I., Huang, C. J., Ting, L. P., 2009. Suppression of hepatitis B viral gene expression by phosphoinositide 5-phosphatase SKIP. *Cell. Microbiol.* 11: 37-50.
- Ijuin, T., Mochizuki, Y., Fukami, K., Funaki, M., Asano, T., Takenawa, T., 2000. Identification and characterization of a novel inositol polyphosphate 5-phosphatase. *J. Biol. Chem.* 275: 10870-5.
- Ijuin, T., Takenawa, T., 2003. SKIP negatively regulates insulin-induced GLUT4 translocation and membrane ruffle formation. *Mol. Cell. Biol.* 23: 1209-20.
- Ijuin, T., Yu, Y. E., Mizutani, K., Pao, A., Tateya, S., Tamori, Y., Bradley, A., Takenawa, T., 2008. Increased insulin action in SKIP heterozygous knockout mice. *Mol. Cell. Biol.* 28: 5184-95.
- Ijuin, T., Takenawa, T., 2012a. Role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP3) 5-phosphatase skeletal muscle- and kidney-enriched inositol polyphosphate phosphatase (SKIP) in myoblast differentiation. *J. Biol. Chem.* 287: 31330-41.
- Ijuin, T., Takenawa, T., 2012b. Regulation of insulin signaling by the phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate phosphatase SKIP through the scaffolding function of Pak1. *Mol. Cell. Biol.* 32: 3570-84.

- Ijuin, T., Hosooka, T., Takenawa, T., 2015a. Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate Phosphatase SKIP Links Endoplasmic Reticulum Stress in Skeletal Muscle to Insulin Resistance. *Mol. Cell. Biol.* 36: 108-18.
- Ijuin, T., Takenawa, T., 2015b. Improvement of insulin signaling in myoblast cells by an addition of SKIP-binding peptide within Pak1 kinase domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 456: 41-6.
- Ijuin, T., Hatano, N., Hosooka, T., Takenawa, T., 2015c. Regulation of insulin signaling in skeletal muscle by PIP3 phosphatase, SKIP, and endoplasmic reticulum molecular chaperone glucose-regulated protein 78. *Biochim. Biophys. Acta.* 1853: 3192-201.
- Ijuin, T., Hatano, N., Takenawa, T., 2016. Glucose-regulated protein 78 (GRP78) binds directly to PIP3 phosphatase SKIP and determines its localization. *Genes Cells* 21: 457-65.
- Jiao, S., Ren, H., Li, Y., Zhou, J., Duan, C., Lu, L., 2013. Differential regulation of IGF-I and IGF-II gene expression in skeletal muscle cells. *Mol. Cell. Biochem.* 373: 107-113.
- Jones, J., Otu, H., Spentzos, D., Kolia, S., Inan, M., Beecken, W. D., Fellbaum, C., Gu, X., Joseph, M., Pantuck, A. J., Jonas, D., Libermann, T. A., 2005. Gene signatures of progression and metastasis in renal cell cancer. *Clin. Cancer Res.*, 11: 5730-5739.
- Liu, G., Zhao, Y., Sun, J. Y., Sun, B. L., 2019. Parkinson's Disease Risk Variant rs1109303 Regulates the Expression of INPP5K and CRK in Human Brain. *Neurosci. Bull.* 35: 365-368.
- McCabe, C. V., Codner, G. F., Allan, A. J., Caulder, A., Christou, S., Loeffler, J., Mackenzie, M., Malzer, E., Mianné, J., Pike, F. J., Hutchison, M., Stewart, M. E., Gates, H., Wells, S., Sanderson, N. D., Teboul, L., 2019. Application of long-read sequencing for robust identification of correct alleles in genome edited animals. *BioRxiv* doi: <https://doi.org/10.1101/838193>.
- Nazeri, A., Roostaei, T., Sadaghiani, S., Chakravarty, M. M., Eberly, S., Lang, A. E., Voineskos, A. N., 2015. Genome-wide variant by serum urate interaction in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 78: 731-41.
- Nizon, M., Küry, S., Péreón, Y., Besnard, T., Quinquis, D., Boisseau, P., Marsaud, T., Magot, A., Mussini, J. M., Mayrargue, E., Barbarot, S., Béziau, S., Isidor, B., 2018. ARL6IP1 mutation causes congenital insensitivity to pain, acromutilation and spastic paraplegia. *Clin. Genet.* 93: 169-172.
- Novarino, G., Fenstermaker, A. G., Zaki, M. S., Hofree, M., Silhavy, J. L., Heiberg, A. D., Abdellateef, M., Rosti, B., Scott, E., Mansour, L., Masri, A., Kayserili, H., Al-Aama, J. Y., Abdel-Salam, G. M. H., Karminejad, A., Kara, M., Kara, B., Bozorgmehr, B., Ben-Omran, T., Mojahedi, F., El Din Mahmoud, I. G., Bouslam, N., Bouhouche, A., Benomar, A., Hanein, S., Raymond, L., Forlani, S., Mascaro, M., Selim, L., Shehata, N., Al-Allawi, N., Bindu, P. S., Azam, M., Gunel, M., Caglayan, A., Bilguvar, K., Tolun, A., Issa, M. Y., Schroth, J., Spencer, E. G., Rosti, R. O., Akizu, N., Vaux, K. K., Johansen, A., Koh, A. A., Megahed, H., Durr, A., Brice, A., Stevanin, G., Gabriel, S. B., Ideker, T., Gleeson, J. G., 2014. Exome sequencing links corticospinal motor neuron disease to common neurodegenerative disorders. *Science.* 343: 506-511.
- Osborn, D. P. S., Pond, H. L., Mazaheri, N., Dejardin, J., Munn, C. J., Mushref, K., Cauley, E. S., Moroni, I., Pasanisi, M. B., Sellars, E. A., Hill, R. S., Partlow, J. N., Willaert, R. K., Bharj, J., Malamiri, R. A., Galehdari, H., Shariati, G., Maroofian, R., Mora, M., Swan, L. E., Voit, T., Conti, F. J., Jamshidi, Y., Manzini, M. C., 2017. Mutations in INPP5K Cause a Form of Congenital Muscular Dystrophy Overlapping Marinesco-Sjögren Syndrome and Dystroglycanopathy. *Am. J. Hum. Genet.* 100: 537-545.
- Pernot, E., Terryn, S., Cheong, S. C., Markadieu, N., Janas, S., Blockmans, M., Jacoby, M., Pouillon, V., Gayral, S., Rossier, B. C., Beauwens, R., Erneux, C., Devuyt, O., Schurmans, S., 2011. The inositol Inpp5k 5-phosphatase affects osmoregulation through the vasopressin-aquaporin 2 pathway in the collecting system. *Pflugers Arch.* 462: 871-83.
- Rahman, P., Huysmans, R. D., Wiradjaja, F., Gurung, R., Ooms, L. M., Sheffield, D. A., Dyson, J. M., Layton, M. J., Sriratana, A., Takada, H., Tiganis, T., Mitchell, C. A., 2011. Silencer of death domains (SODD) inhibits skeletal muscle and kidney enriched inositol 5-phosphatase (SKIP) and regulates phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt signaling to the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 286: 29758-70.

- Rahman, M. R., Islam, T., Zaman, T., Shahjaman, M., Karim, M. R., Huq, F., Quinn, J. M. W., Holsinger, R. M. D., Gov, E., Moni, M. A., 2020. Identification of biomarkers and pathways to identify novel therapeutic targets in Alzheimer's disease: Insights from a systems biomedicine perspective. *Genomics* 112: 1290-1299.
- Ramos, A. R., Elong Edimo, W., Erneux, C., 2018. Phosphoinositide 5-phosphatase activities control cell motility in glioblastoma: Two phosphoinositides PI(4,5)P<sub>2</sub> and PI(3,4)P<sub>2</sub> are involved. *Adv. Biol. Regul.* 67:40-48. doi: 10.1016/j.jbior.2017.09.001.
- Ramos, A. R., Ghosh, S., Erneux, C., 2019a. The impact of phosphoinositide 5-phosphatases on phosphoinositides in cell function and human disease. *J. Lipid Res.* 60: 276-286.
- Ramos, A. R., Ghosh, S., Dedobbeleer, M., Robe, P. A., Rogister, B., Erneux, C., 2019b. Lipid phosphatases SKIP and SHIP2 regulate fibronectin-dependent cell migration in glioblastoma. *FEBS J.* 286: 1120-1135.
- Ramos, A. R., Ghosh, S., Suhel, T., Chevalier, C., Obeng, E. O., Fafilek, B., Krejci, P., Beck, B., Erneux, C., 2020. Phosphoinositide 5-phosphatases SKIP and SHIP2 in ruffles, the endoplasmic reticulum and the nucleus: An update. *Adv. Biol. Regul.* 75:100660. doi: 10.1016/j.jbior.2019.100660.
- Ren, H., Yin, P., Duan, C.J., 2008. IGF-BP-5 regulates muscle cell differentiation by binding to IGF-II and switching on the IGF-II auto-regulation loop. *Cell Biol.* 182: 979-91.
- Rual, J.F., Venkatesan, K., Hao, T., Hirozane-Kishikawa, T., Dricot, A., Li, N., Berriz, G. F., Gibbons, F. D., Dreze, M., Ayivi-Guedehoussou, N., Klitgord, N., Simon, C., Boxem, M., Milstein, S., Rosenberg, J., Goldberg, D. S., Zhang, L. V., Wong, S. L., Franklin, G., Li, S., Albala, J. S., Lim, J., Fraughton, C., Llamas, E., Cevik, S., Bex, C., Lamesch, P., Sikorski, R. S., Vandenhaute, J., Zoghbi, H. Y., Smolyar, A., Bosak, S., Sequerra, R., Doucette-Stamm, L., Cusick, M. E., Hill, D. E., Roth, F. P., Vidal, M., 2005. Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature* 437: 1173-8.
- Schmid, A. C., Wise, H. M., Mitchell, C. A., Nussbaum, R., Woscholski, R., 2004. Type II phosphoinositide 5-phosphatases have unique sensitivities towards fatty acid composition and head group phosphorylation. *FEBS Lett.* 576: 9-13.
- Wiessner, M., Roos, A., Munn, C. J., Viswanathan, R., Whyte, T., Cox, D., Schoser, B., Sewry, C., Roper, H., Phadke, R., Marini Bettolo, C., Barresi, R., Charlton, R., Bönnemann, C. G., Abath Neto, O., Reed, U. C., Zanoteli, E., Araújo Martins Moreno, C., Ertl-Wagner, B., Stucka, R., De Goede, C., Borges da Silva, T., Hathazi, D., Dell'Aica, M., Zahedi, R. P., Thiele, S., Müller, J., Kingston, H., Müller, S., Curtis, E., Walter, M. C., Strom, T. M., Straub, V., Bushby, K., Muntoni, F., Swan, L. E., Lochmüller, H., Senderek, J., 2017. Mutations in INPP5K, Encoding a Phosphoinositide 5-Phosphatase, Cause Congenital Muscular Dystrophy with Cataracts and Mild Cognitive Impairment. *Am. J. Hum. Genet.* 100: 523-536.
- Wiradjaja, F., Ooms, L. M., Whisstock, J. C., McColl, B., Helfenbaum, L., Sambrook, J. F., Gething, M. J., Mitchell, C. A., 2001. The yeast inositol polyphosphate 5-phosphatase Inp54p localizes to the endoplasmic reticulum via a C-terminal hydrophobic anchoring tail: regulation of secretion from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 276: 7643-53.
- Xiong, Q., Deng, C. Y., Chai, J., Jiang, S. W., Xiong, Y. Z., Li, F. E., Zheng, R., 2009. Knockdown of endogenous SKIP gene enhanced insulin-induced glycogen synthesis signaling in differentiating C2C12 myoblasts. *BMB Rep.* 42: 119-24.
- Xiong, Q., Chai, J., Zhang, P. P., Wu, J., Jiang, S. W., Zheng, R., Deng, C. Y., 2011. MyoD control of SKIP expression during pig skeletal muscle development. *Mol. Biol. Rep.* 38: 267-74.
- Xiong, Q., Chai, J., Deng, C., Jiang, S., Liu, Y., Huang, T., Suo, X., Zhang, N., Li, X., Yang, Q., Chen, M., Zheng, R., 2012. Characterization of porcine SKIP gene in skeletal muscle development: polymorphisms, association analysis, expression and regulation of cell growth in C2C12 cells. *Meat Sci.* 92: 490-7.
- Yamamoto, Y., Yoshida, A., Miyazaki, N., Iwasaki, K., and Sakisaka, T., 2014. Arl6IP1 has the ability to shape the mammalian ER membrane in a reticulon-like fashion. *Biochem. J.* 458: 69-79.
- Yang, Y., Wang, G., Huang, X., Du, Z., 2015. Crystallo-graphic and modelling studies suggest that the SKICH domains from different protein families share a common Ig-like fold but harbour substantial structural variations. *J. Bio-mol. Struct. Dyn.* 33: 1385-1398.

Yousaf, S., Sheikh, S. A., Riazuddin, S., Waryah, A. M., Ahmed, Z. M., 2018. INPP5K variant causes autosomal recessive congenital cataract in a Pakistani family. *Clin. Genet.* 93: 682-686.

Zhu, W., Luo, X., Adnan, A., Yu, P., Zhang, S., Huo, Z., Xu, Q., Pang, H., 2018. Association analysis of NUCKS1 and INPP5K polymorphism with Parkinson's disease. *Genes Genet. Syst.* 93: 59-64.

Zirin, J., Nieuwenhuis, J., Samsonova, A., Tao, R., Perri-mon, N., 2015. Regulators of autophagosome formation in *Drosophila* muscles. *PLoS Genet.* 11, e1005006.